



Faculté des Sciences
Génétique des Microorganismes
Prof. R. F. Matagne

Clonage, caractérisation et étude
de la régulation transcriptionnelle du gène *Aox1* encodant
l'oxydase alternative chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Denis BAURAIN

Dissertation présentée
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Année académique 2002-2003

Au moment d'envoyer mes paquets de feuilles à la reliure, il me reste à y glisser un petit mot de gratitude à l'intention de celles et ceux qui m'ont aidé à en arriver là aujourd'hui. Hormis le FNRS — qui a financé ce projet —, je voudrais vivement remercier...

Le Professeur René. F. Matagne pour avoir accepté de diriger cette thèse de doctorat. Disponible tant au laboratoire que durant ces longs mois de rédaction, il m'a prodigué suggestions et encouragements véritablement décisifs pour la réalisation de ce travail. A l'image des BBQs printaniers sur sa pelouse, il a par ailleurs su créer dans son service une ambiance familiale et détendue dont je garderai à jamais la nostalgie.

Le Dr. Monique Dinant — assistée de son irremplaçable Nadine — pour m'avoir accompagné depuis mon mémoire de licence dans l'exploration des mystères de l'oxydase alternative de *Chlamydomonas*. Sa contribution à nombre d'expériences cruciales et sa relecture attentive du manuscrit ont été très précieuses.

Le Dr. Roland Loppes pour sa disponibilité et ses explications en matière de transformation de *Chlamydomonas*, d'activité arylsulfatase ou de métabolisme de l'azote ; sans oublier Michèle pour son aide bienvenue lors du passage de la théorie à la pratique.

Claire pour les heures passées à faire mon éducation en biologie moléculaire et en biochimie, de même que pour les discussions passionnées devant des boîtes à tartines vides ; Francéline pour ses conseils judicieux et son humour grinçant.

Éliane et Joseph pour leur assistance technique. J'ai depuis longtemps renoncé à compter les bennes de milieu coulés, les nuées de tubes lavés et les myriades de souches repiquées au cours de ces dernières années.

Christophe et Blandine, étudiants de graduat en biochimie que j'ai eu la chance d'encadrer. Ils ont apporté chacun leur pierre à cet édifice — souvent efficacement, parfois maladroitement, mais toujours avec enthousiasme.

Marc pour son amitié, son bon sens et les bavardages incessants que nous avons dans notre petit bureau ; Pierre pour les parties de squash à trois, les temps de midi chez les VTs et son humour dévastateur. Tenez bien le cap, vous deux ! Même si la fin de la traversée est solitaire, elle n'en vaut pas moins la peine.

Mes amis de longue date — Benoît, David, Jean-Phi et Xavier — pour ne pas m'avoir reproché mes indisponibilités chaque semaine plus prononcées. Je compte bien vous revoir à ma défense ! On a des masses de terrasses en retard à arpenter ensemble !

Mes parents, historiens tous les deux, pour m'avoir donné depuis tout petit le goût des Sciences — indépendamment de leur prétendue dureté ou mollesse — et avoir approuvé tous mes choix avec philosophie ; mes beaux-parents et mon beau-frère pour leur accueil et leurs encouragements permanents ; les autres membres de ma famille pour leur amour.

Domi, pour avoir accepté de devenir ma femme en dépit des difficultés et des incertitudes de la vie de chercheur. Sans jamais faillir, tu m'as soutenu et supporté tout au long de ces quatre années. Si j'y suis finalement arrivé, c'est surtout grâce à toi. Je te dédie dès lors cette victoire, ma Chérie.

Résumé

Au sein de la membrane interne des mitochondries, quatre complexes multiprotéiques sont impliqués dans le transfert des électrons depuis les équivalents réducteurs jusqu'à l'oxygène moléculaire. L'énergie associée à ce transport au travers des complexes I, III et IV est couplée à la synthèse d'ATP par l'intermédiaire d'un gradient de protons. Chez les plantes supérieures, de nombreux champignons et quelques protistes, une seconde voie de transfert diverge de la voie principale au niveau du *pool* d'ubiquinone, celui-ci étant alors oxydé directement par l'oxygène moléculaire. Lorsque les électrons empruntent cette voie alternative, deux sites d'éjection de protons sont court-circuités et l'énergie produite est dissipée sous forme de chaleur. Cette réaction est catalysée par une enzyme unique, l'oxydase alternative (AOX), souvent encodée par une petite famille multigénique chez les plantes supérieures. Une activité accrue de la voie alternative est observée suite à divers stimuli développementaux et environnementaux, en particulier en conditions de stress. Cette augmentation d'activité résulte d'une activation transcriptionnelle du gène *Aox* et/ou de modifications post-traductionnelles de la protéine mature. L'AOX de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* est encodée par deux gènes différents, *Aox1* et *Aox2*, le premier étant beaucoup plus transcrit que le second. Les cDNAs *Aox1* et *Aox2*, de même que la séquence génomique *Aox2*, ont été isolés et caractérisés dans notre laboratoire.

Dans un premier temps, nous avons entrepris le clonage et la caractérisation de la séquence génomique *Aox1*, ce qui nous a permis de comparer sa structure avec celle de son homologue *Aox2*. Ensuite, afin d'étudier sa régulation transcriptionnelle, nous avons fusionné un segment de 1,4 kb contenant la région promotrice *Aox1* à la région codante du gène (*Ars*) de l'arylsulfatase et mesuré les activités ARS dans des transformants porteurs de la construction chimérique. Nous avons ainsi montré que le promoteur *Aox1* est insensible à la plupart des inducteurs classiques de l'AOX, parmi lesquels des agents de stress, des inhibiteurs respiratoires et des métabolites. En revanche, l'expression du gène *Aox1* répond à la nature de la source d'azote, sa transcription étant réprimée par l'ammonium et stimulée par le nitrate. De plus, en milieu contenant du nitrate, l'inactivation de la nitrate réductase (première enzyme de la voie d'assimilation du nitrate) conduit à une expression du gène *Aox1* encore plus importante. Nous avons en outre observé que cette stimulation par le nitrate se répercute aux niveaux protéique et respiratoire.

Une étude de délétion de la région promotrice *Aox1* indique qu'un segment court (de -253 à +59 par rapport à l'origine de transcription) est suffisant pour assurer la transcription et la régulation du gène, mais que son expression maximale requiert également des éléments distaux. Aucun motif nucléotidique susceptible d'intervenir dans l'expression du gène *Aox1* n'a été identifié à l'issue d'une analyse bioinformatique du promoteur. L'effet de la nature de la source d'azote sur l'expression de l'AOX est interprété sous l'angle d'une optimisation de la synthèse d'ATP mitochondrial sans modification de l'activité respiratoire, en relation avec un possible accroissement de la production d'ATP photosynthétique lorsque le nitrate est utilisé comme source d'azote.

Matter and energy had ended and with it space and time. Even AC¹ existed only for the sake of the one last question that it had never answered from the time a half-drunken computer attendant ten trillion years before had asked the question of a computer that was to AC far less than was a man to Man.

All other questions had been answered, and until this last question was answered also, AC might not release his consciousness.

All collected data had come to a final end. Nothing was left to be collected.

But all collected data had yet to be completely correlated and put together in all possible relationships.

A timeless interval was spent in doing that.

And it came to pass that AC learned how to reverse the direction of entropy.

But there was now no man to whom AC might give the answer of the last question. No matter. The answer—by demonstration—would take care of that, too.

For another timeless interval, AC thought how best to do this. Carefully, AC organized the program.

The consciousness of AC encompassed all of what had once been a Universe and brooded over what was now Chaos. Step by step, it must be done.

And AC said, "LET THERE BE LIGHT!"

And there was light—

from "The Last Question"
by Isaac Asimov (1920-1992)
Copyright © 1956 by Columbia Publications, Inc.

I call this experiment "replaying life's tape." You press the rewind button and, making sure you thoroughly erase everything that actually happened, go back to any time and place in the past—say, to the seas of the Burgess Shale. Then let the tape run again and see if the repetition looks at all like the original. [...] Run the tape again, and let the tiny twig of *Homo sapiens* expire in Africa. Other hominids may have stood on the threshold of what we know as human possibilities, but many sensible scenarios would never generate our level of mentality. Run the tape again, and this time Neanderthal perishes in Europe and *Homo erectus* in Asia (as they did in our world). The sole surviving human stock, *Homo erectus* in Africa, stumbles along for a while, even prospers, but does not speciate and therefore remains stable. A mutated virus then wipes *Homo erectus* out, or a change in climate reconverts Africa into inhospitable forest. One little twig on the mammalian branch, a lineage with interesting possibilities that were never realized, joins the vast majority of species in extinction. So what? Most possibilities are never realized, and who will ever know the difference?

from "Wonderful Life:
The Burgess Shale and the Nature of History"
by Stephen Jay Gould (1941-2002)
Copyright © 1989 by W. W. Norton & Co.

¹ Analog Computer

Table des matières

I	Introduction	1
1	Chaîne de transport d'électrons mitochondriale	2
1.1	Complexes respiratoires	2
1.2	Phosphorylation oxydative et contrôle respiratoire	3
1.3	Enzymes additionnelles	4
2	Oxydase alternative (AOX)	5
2.1	Brève introduction historique	5
2.2	Activité de l'oxydase alternative	5
2.3	Nature moléculaire de l'oxydase alternative	6
2.3.1	Structure de l'AOX	6
2.3.2	Site actif de l'AOX	7
2.3.3	Activation post-traductionnelle de l'AOX	10
2.3.4	Domaines régulateurs de l'AOX	11
2.4	Génétique de l'oxydase alternative	12
2.4.1	Gènes <i>Aox</i>	12
2.4.2	Expression des gènes <i>Aox</i>	14
2.5	Régulation et rôle de la voie alternative	15
2.5.1	Régulation de la voie alternative	15
2.5.2	Rôle de la voie alternative	16
3	Respiration mitochondriale chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	18
3.1	Description de l'organisme	18
3.1.1	Génomes nucléaires et chloroplastiques	19
3.1.2	Transformation du génome nucléaire	19
3.2	Génétique de la mitochondrie	20
3.2.1	Génome mitochondrial	20
3.2.2	Mutants mitochondriaux	20
3.3	Oxydase alternative	20
3.3.1	Études biochimiques	21
3.3.2	Caractérisation moléculaire	21
3.3.3	Tentatives d'inactivation des gènes <i>Aox</i>	23
3.4	Buts du travail	23

II	Résultats	25
4	Clonage et caractérisation du gène <i>Aox1</i>	26
4.1	Amplification et clonage du gène <i>Aox1</i>	26
4.2	Séquençage du gène <i>Aox1</i>	26
4.3	Comparaison des gènes <i>Aox1</i> et <i>Aox2</i>	27
4.4	Origine du cDNA chimérique <i>Aox1</i>	28
5	Étude de la régulation transcriptionnelle du gène <i>Aox1</i>	34
5.1	Construction du plasmide <i>Aox1/Ars</i>	34
5.1.1	Intérêt de l'arylsulfatase comme gène rapporteur	34
5.1.2	Stratégie de construction	35
5.2	Transformation de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	35
5.3	Analyse moléculaire des transformants	36
5.3.1	Détection de la construction <i>Aox1/Ars</i> par hybridation sur <i>Southern blot</i>	37
5.3.2	Analyse de la taille approximative du promoteur de la construction <i>Aox1/Ars</i> chez les transformants	38
5.4	Étude de l'expression de la construction chimérique <i>Aox1/Ars</i>	40
5.4.1	Effet des inducteurs classiques de l'AOX	40
5.4.2	Effet des mutations <i>dum</i>	41
5.4.3	Effet de la source d'azote	42
5.4.4	Effet de l'azoture de sodium	43
5.4.5	Effet de l'inactivation de la nitrate réductase	44
5.5	Étude de la régulation transcriptionnelle du gène <i>Aox2</i>	46
5.6	Étude de l'expression de l'AOX endogène	47
5.6.1	Immunodétection de l'AOX	47
5.6.2	Étude de l'activité respiratoire	49
6	Analyse de la structure du promoteur <i>Aox1</i>	50
6.1	Identification d'un promoteur <i>Aox1</i> minimal	50
6.1.1	Construction des plasmides <i>Aox1Δ1/Ars</i> à <i>Aox1Δ6/Ars</i>	50
6.1.2	Transformation de <i>C. reinhardtii</i> et expression des constructions	51
6.2	Dissection de la région 3' du promoteur <i>Aox1</i>	53
6.3	Recherche et discussion d'éléments conservés dans le promoteur <i>Aox1</i>	55
III	Discussion	58
7	Discussion	59
7.1	Structures comparées des gènes <i>Aox1</i> et <i>Aox2</i>	59
7.2	Absence de réponse du gène <i>Aox1</i> aux inducteurs classiques	60
7.3	Régulation du gène <i>Aox1</i> par la source d'azote	61
7.4	Effet résiduel de l'azoture de sodium sur le gène <i>Aox1</i>	62
7.5	Structure du promoteur <i>Aox1</i>	63
7.6	Signification physiologique de la régulation de l'AOX	64

IV	Matériel et Méthodes	66
8	Matériel	67
8.1	Souches de microorganismes	67
8.2	Plasmides	67
8.3	Oligonucléotides	68
9	Méthodes	71
9.1	Milieus et conditions de culture	71
9.1.1	<i>Escherichia coli</i>	71
9.1.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	71
9.2	Techniques microbiologiques	72
9.2.1	Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	72
9.2.2	Transformation de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	72
9.2.3	Croisement de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	72
9.2.4	Cytoduction de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	73
9.2.5	Analyse phénotypique en gouttes	73
9.2.6	Analyse phénotypique par répliques	73
9.3	Techniques biochimiques	73
9.3.1	Détection <i>in situ</i> de l'activité arylsulfatase	73
9.3.2	Dosage de l'activité arylsulfatase	74
9.3.3	Dosage de l'activité NADH:nitrate réductase	74
9.3.4	Préparation de fractions membranaires brutes	74
9.3.5	Immunodétection de l'oxydase alternative	75
9.3.6	Dosage de l'activité cytochrome <i>c</i> oxydase	75
9.3.7	Dosage de l'activité NADH:ubiquinone oxydoréductase	75
9.3.8	Quantification des protéines	75
9.3.9	Mesures de respiration <i>in vivo</i>	75
9.4	Techniques moléculaires	76
9.4.1	Extraction d'ADN plasmidique d' <i>Escherichia coli</i>	76
9.4.2	Extraction d'ADN total de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	76
9.4.3	Électrophorèse d'ADN en gel d'agarose	77
9.4.4	Récupération d'ADN en gel d'agarose	77
9.4.5	Purification d'ADN	78
9.4.6	Précipitation d'ADN	78
9.4.7	Restriction d'ADN	78
9.4.8	Génération d'ADN aux extrémités franches	78
9.4.9	Déphosphorylation d'ADN	78
9.4.10	Adénylation d'ADN	78
9.4.11	Ligation d'ADN	78
9.4.12	Amplification d'ADN par PCR	79
9.4.13	Séquençage d'ADN	79
9.4.14	Hybridation d'ADN sur <i>Southern blot</i>	80
V	Bibliographie	82
	Bibliographie	83

VI	Annexes	97
A	Origine du cDNA chimérique <i>Aox1</i>	98
B	Séquences nucléotidiques	100
B.1	Plasmides pJD54 et pJD100	100
B.1.1	pJD54	100
B.1.2	pJD100	100
B.2	Constructions chimériques <i>Aox1/Ars</i> et <i>Aox2/Ars</i>	100
B.2.1	<i>Aox1/Ars</i>	100
B.2.2	<i>Aox2/Ars</i>	101
B.3	Constructions chimériques <i>Aox1Δ1/Ars</i> à <i>Aox1Δ6/Ars</i>	101
B.3.1	<i>Aox1Δ1/Ars</i>	101
B.3.2	<i>Aox1Δ2/Ars</i>	101
B.3.3	<i>Aox1Δ3/Ars</i>	102
B.3.4	<i>Aox1Δ4/Ars</i>	102
B.3.5	<i>Aox1Δ5/Ars</i>	102
B.3.6	<i>Aox1Δ6/Ars</i>	102
B.4	Constructions chimériques <i>Aox1Δ51/Ars</i> à <i>Aox1Δ53/Ars</i>	103
B.4.1	<i>Aox1Δ51/Ars</i>	103
B.4.2	<i>Aox1Δ52/Ars</i>	103
B.4.3	<i>Aox1Δ53/Ars</i>	103
C	Enzymes sensibles à l'azoture	104
D	Analyse bioinformatique des promoteurs <i>Aox1</i> et <i>Aox2</i>	108
D.1	Relevé d'éléments conservés chez <i>C. reinhardtii</i>	108
D.2	Analyse du promoteur <i>Aox1</i>	109
D.3	Analyse du promoteur <i>Aox2</i>	111
D.4	Étude de simulation appliquée au promoteur <i>Aox1</i>	113
D.5	Code source	119

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Chaîne de transport d'électrons mitochondriale

La membrane interne des mitochondries contient quatre complexes multienzymatiques, les complexes I à IV (Figure 1.1), qui assurent le transfert d'électrons depuis les équivalents réducteurs produits en amont (NADH, NADPH et succinate *via* le cofacteur FADH₂) jusqu'à l'oxygène moléculaire, avec formation de molécules d'eau. Le complexe V (ou F₀F₁-ATP synthase) est également une enzyme de la membrane mitochondriale interne (*revue par Siedow 1995 ; Siedow et Umbach 1995*).

1.1 Complexes respiratoires

Le complexe I (NADH:ubiquinone oxydoréductase) capte les deux électrons d'une molécule de NADH pour réduire une molécule d'ubiquinone (UQ) en ubiquinol (Figure 1.2). À l'inverse des complexes intégrés dans la membrane, l'ubiquinone existe sous la forme d'un *pool* de transporteurs se mouvant librement dans la bicouche lipidique. La NADH:ubiquinone oxydoréductase est extrêmement complexe et volumineuse, avec un mononucléotide de flavine (FMN) et quatre à neuf centres rédox fer-soufre (Fe/S) imbriqués dans plus de trente polypeptides différents, dont neuf sont encodés par le génome mitochondrial chez les plantes supérieures. L'activité enzymatique de ce complexe est inhibée par la roténone et la piéricidine A.

Le complexe II (succinate:ubiquinone oxydoréductase), qui appartient aussi au cycle TCA, est la seule enzyme de ce cycle qui ne soit pas libre dans la matrice mitochondriale. Son rôle est d'oxyder le succinate en fumarate par transfert de deux de ses électrons au *pool* d'ubiquinone. De structure beaucoup plus simple, il comprend quatre polypeptides, le plus souvent codés par le génome nucléaire, trois

centres Fe/S, deux sites de liaison à l'ubiquinone, un cytochrome *b* et un seul dinucléotide de flavine-adenine (FAD/FADH₂), qui sert de transporteur intermédiaire. Le complexe II est inhibé par le malonate et la thénoylfluoroacétone.

Le complexe III (ubiquinone:cytochrome *c* oxydoréductase) s'alimente en électrons au *pool* d'ubiquinone pour les transférer un par un au cytochrome *c* au cours du cycle de l'ubiquinone (cycle Q). Le cytochrome *c* est une petite protéine périphérique localisée sur la face externe de la membrane interne, la seule à ne pas faire partie intégrante de la bicouche lipidique. Chez les végétaux, le centre catalytique du complexe III comporte trois polypeptides entourés de deux à trois *core proteins* et de trois à six autres petits polypeptides. Ce complexe est souvent appelé cytochrome *bc*₁, à cause de la présence des cytochromes *b* et *c*₁ à côté d'un centre Fe/S (protéine de Rieske) comme transporteurs d'électrons intermédiaires. Chez tous les organismes étudiés jusqu'ici, l'apocytochrome *b* (qui fixe deux hèmes de type *b*) est encodé par le génome mitochondrial. L'antimycine A et le myxothiazol sont deux inhibiteurs du complexe III.

Le complexe IV (cytochrome *c* oxydase) catalyse successivement le transfert de quatre électrons du cytochrome *c* à l'oxygène moléculaire, avec pour résultat la production de deux molécules d'eau, suite au prélèvement de quatre protons dans la matrice. Composé de sept à treize polypeptides, dont les trois plus grands sont encodés par le génome mitochondrial (sauf chez quelques légumineuses, où le gène de la sous-unité II a été transféré dans le noyau), le complexe IV compte en outre quatre cofacteurs rédox : un centre cuivre dinucléaire Cu_A, un centre cuivre mononucléaire Cu_B et deux hèmes *a*

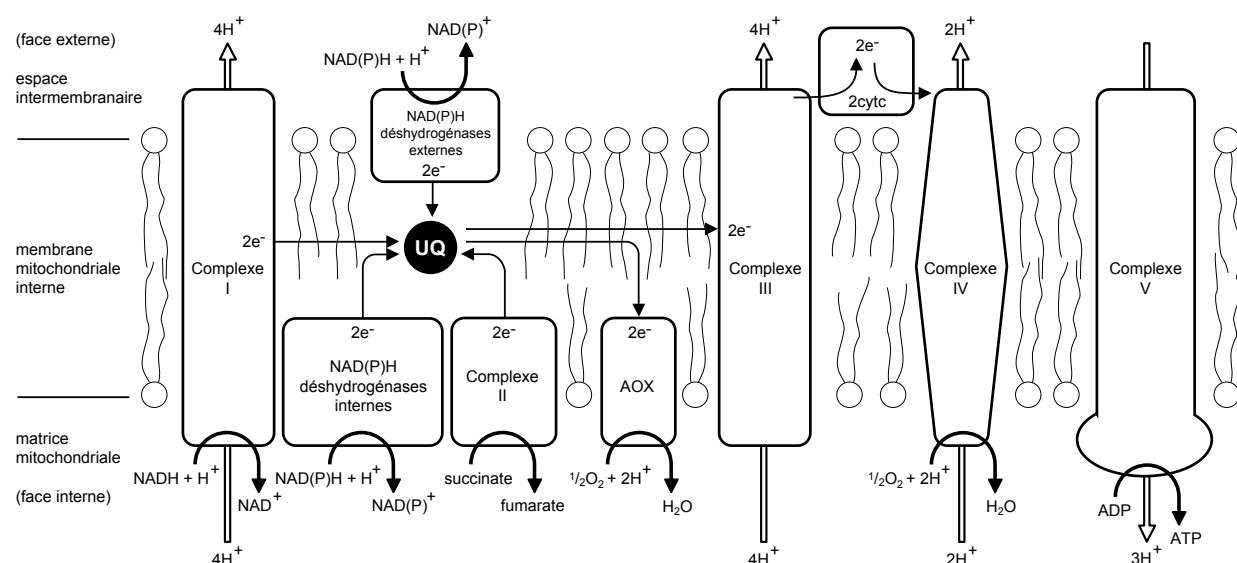


FIG. 1.1. Chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne des végétaux. UQ: ubiquinone ; cyt c: cytochrome c. Les NAD(P)H déshydrogénases externes et internes correspondent en fait à quatre enzymes distinctes (adapté de Lambers 1997 ; Millenaar 2000 ; Moller 2001).

et a_3 . L'hème a_3 et le centre Cu_B sont associés en un centre dinucléaire servant de site catalytique pour la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Son activité enzymatique est inhibée par le cyanure (CN^-), l'azoture (N_3^-), le sulfure d'hydrogène (H_2S), le monoxyde et le dioxyde de carbone (CO/CO_2) et le monoxyde d'azote (NO).

1.2 Phosphorylation oxydative et contrôle respiratoire

Le transfert d'électrons de l'ubiquinol à l'oxygène moléculaire *via* les complexes III et IV constitue la

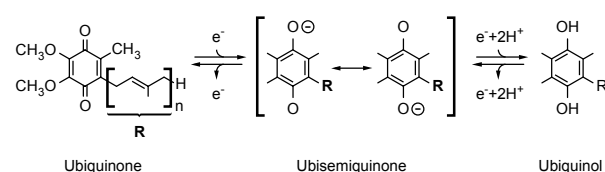


FIG. 1.2. Structure et états rédox de l'ubiquinone. L'ubiquinone est une 1,4-benzoquinone substituée, dont la chaîne latérale (R) est composée de 10 unités isoprényles. La réduction de l'ubiquinone en ubiquinol nécessite deux électrons et deux protons. La réduction avec un seul électron donne l'ubisemiquinone (adapté de Lambers 1997 ; Millenaar 2000).

voie des cytochromes (*cytochrome pathway*), connue aussi sous le nom de voie principale. Chaque fois que deux électrons sont transférés du NADH jusqu'à un atome d'oxygène, dix protons de la matrice sont pompés et éjectés dans l'espace intermembranaire, contribuant à l'établissement d'un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne. Les sites d'éjection de protons sont les complexes I (4H^+), III (4H^+) et IV (2H^+).

Le complexe V (F_0F_1 -ATP synthase) a comme fonction d'utiliser l'énergie libre du gradient de protons pour la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Cette enzyme est composée d'un canal intégré dans la membrane interne, par lequel refluent spontanément les protons, et d'une tête globulaire saillant dans la matrice et assurant la fonction catalytique (Figure 1.1). Lorsque dix protons retournent dans la matrice au travers de son canal, trois ATPs sont synthétisés par la tête du complexe V. Ce processus porte le nom de phosphorylation oxydative.

En l'absence d'ADP ou de Pi , le complexe V est incapable de dissiper le gradient de protons. Cette situation de contrôle respiratoire est liée au couplage existant entre le reflux des protons vers la matrice et la phosphorylation d'ADP en ATP. En carence d'ADP, la charge énergétique du gradient de protons s'accroît peu à peu et inhibe progressivement l'activité des trois complexes participant à sa consti-

tution (I, III et IV). La faible consommation d'oxygène mesurée lorsque le gradient est à son maximum correspond à la respiration de type *state 4*, par opposition à celle observée en suffisance d'ADP (et de Pi), qualifiée de type *state 3*.

1.3 Enzymes additionnelles

À côté des cinq complexes multienzymatiques décrits ci-dessus, les mitochondries végétales et fongiques présentent deux à quatre oxydases supplémentaires, vraisemblablement composées chacune d'une unique flavoprotéine. Dans le cas des plantes supérieures, deux NADH et deux NADPH déshydrogénases insensibles à la roténone ont été identifiées (Figure 1.1). Localisées sur la face externe de la membrane mitochondriale interne, deux des déshydrogénases se chargent de l'oxydation des équivalents réducteurs cytosoliques (NADH et NADPH), tandis que les deux autres, situées sur la face interne, entrent en compétition avec le complexe I pour la réduction des équivalents réducteurs matriciels (NADH et NADPH). Chacune de ces quatre enzymes alimente le *pool* d'ubiquinone sans concourir à la translocation de protons. C'est ainsi qu'une paire d'électrons passant par l'une de ces déshydrogénases distinctes du complexe I ne pourra générer que deux ATPs au lieu de trois. En raison de sa nature non phosphorylante, la même remarque s'applique pour les électrons venant du succinate par l'intermédiaire du complexe II (*revue par* Siedow 1995; Mackenzie et McIntosh 1999; Joseph-Horne et al. 2001; Moller 2001).

Une autre différence majeure entre les mitochondries animales et celles des plantes supérieures et de nombreux autres organismes (divers champignons, protistes, algues unicellulaires) est sans aucun doute l'existence d'une voie alternative (*alternative pathway*) capable de transférer directement les électrons de l'ubiquinol à l'oxygène moléculaire, court-circuitant ainsi les complexes III et IV de la voie des cytochromes (Figure 1.1). Cette seconde voie dépend de l'activité d'une enzyme unique, l'oxydase alternative (AOX). Elle a la particularité de ne pas être phosphorylante et de dissiper l'énergie libre du transport électronique sous forme de chaleur. Les électrons transitant par l'oxydase alternative ne conduisent qu'à la production d'un seul ATP au maximum, grâce aux protons éventuellement exportés au niveau du complexe I. Comme cette voie est insensible aux inhibiteurs de la voie

des cytochromes, tels que le cyanure, elle est aussi connue sous le nom de voie résistante ou insensible au cyanure (*cyanide-resistant/insensitive pathway*). Son activité enzymatique est cependant bloquée par l'acide salicylhydroxamique (SHAM) et le n-propyl gallate (PG).

Récemment, il est apparu qu'en sus des enzymes non phosphorylantes déjà décrites, les mitochondries végétales possèdent également une protéine capable de découpler le transfert d'électrons de la synthèse d'ATP. De fonctionnement similaire à ses équivalentes chez les mammifères, la protéine découplante (UCP pour *uncoupling protein*) des plantes supérieures semble avoir le même effet immédiat que l'AOX, à savoir dissiper l'énergie libre sous forme de chaleur. Il faut cependant signaler que ces deux enzymes découplent la respiration selon des mécanismes fondamentalement différents. Ainsi, l'UCP réduit directement la charge énergétique de la membrane interne en organisant le reflux des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice (indépendamment de la présence d'ADP et de Pi), tandis que l'AOX ne modifie en rien l'état du gradient de protons (*revue par* Affourtit et al. 2001).

Chapitre 2

Oxydase alternative (AOX)

2.1 Brève introduction historique

La respiration résistante au cyanure a été décrite pour la première fois par Genevois (1929) dans des plantules de pois de senteur. Des études physiologiques menées sur des plantes entières et des tissus intacts ont par la suite établi que cette voie alternative est à la base de la chaleur dégagée par les inflorescences d'Aracées (Lance 1972 ; revue par Meeuse 1975). Avec l'avènement des techniques d'isolement de mitochondries, les travaux se sont focalisés sur l'étude des activités relatives des voies sensible et résistante au cyanure, par des mesures de respiration en présence de KCN ou de SHAM (Bahr et Bonner 1973a,b ; revue par Moore et Siedow 1991). En 1978, une quinol-oxydase résistante au cyanure et sensible au SHAM a été solubilisée à partir de mitochondries d'*Arum maculatum* (Huq et Palmer 1978 ; Rich 1978) et l'activité correspondante a été attribuée à une enzyme unique, l'oxydase alternative (AOX). Partiellement purifiée dès 1986 (Bonner et al. ; Elthon et McIntosh), son instabilité et son activité limitée *in vitro* ont longtemps empêché d'en étudier les caractéristiques cinétiques et structurales. Un nouveau pas a néanmoins été franchi lors de la purification de l'AOX de *Sauromatum guttatum* (Elthon et McIntosh 1986) et de la préparation d'anticorps dirigés contre cette protéine. D'abord polyclonaux (Elthon et McIntosh 1987), puis monoclonaux (Elthon et al. 1989b), ces anticorps reconnaissaient trois polypeptides apparentés dont les masses moléculaires étaient respectivement de 35, 36 et 37 kDa. Leur présence était corrélée à l'apparition de la respiration résistante au cyanure et au développement de la thermogenèse chez cette Aracée (Elthon et al. 1989a,b). La spécificité d'un anticorps monoclonal (AOA pour AOX *all*) vis-à-vis d'un oligopeptide très conservé (Finnegan et al. 1999) a permis de

confirmer la présence de l'AOX chez de nombreuses plantes supérieures, mais également chez plusieurs champignons (à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, dépourvus de voie alternative) et chez quelques protistes (revue par Day et al. 1995 ; Siedow et Umbach 1995 ; Joseph-Horne et al. 2001). Parallèlement, ces anticorps ont permis l'isolement du cDNA (Rhoads et McIntosh 1991), puis du gène (Rhoads et McIntosh 1993) *Aox1* chez *S. guttatum*, conduisant aux premiers modèles structuraux de la protéine et de son site actif (Moore et Siedow 1991 ; Siedow et al. 1995 ; Moore et al. 1995). Actuellement, on dispose d'une impressionnante série de séquences d'origines variées (revue par Umbach et Siedow 2000 ; Considine et al. 2002) et un homologue chloroplastique de l'AOX a récemment été identifié (Wu et al. 1999 ; Carol et al. 1999). Ces dix dernières années, des progrès considérables relatifs à la compréhension de la structure et de la régulation de l'activité de l'AOX ont été réalisés, en dépit du mystère qui entoure encore le rôle exact de cette enzyme (revue par Vanlerberghe et McIntosh 1997 ; Berthold et al. 2000 ; Siedow et Umbach 2000 ; Joseph-Horne et al. 2001 ; Affourtit et al. 2002).

2.2 Activité de l'oxydase alternative

Bahr et Bonner (1973a,b) ont été les premiers à étudier la répartition des électrons entre la voie des cytochromes et la voie alternative sur des mitochondries isolées¹. En titrant l'activité de l'AOX à l'aide

1. La respiration des végétaux est traditionnellement décrite en termes de capacité, d'activité et d'engagement. Ainsi, la capacité de la voie alternative fait référence à l'activité respiratoire maximale susceptible de transiter par l'AOX dans un tissu donné. Elle est déterminée en mesurant la fraction de la respiration totale inhibée par le SHAM en présence d'une concentra-

de SHAM, ils ont à l'époque conclu qu'elle était thermodynamiquement défavorisée et n'entrait en action qu'après saturation ou inhibition de la voie principale, lorsque le *pool* d'ubiquinone est majoritairement à l'état réduit.

Quinze ans plus tard, la mise au point de l'électrode-Q permettant de mesurer simultanément la consommation d'oxygène et l'équilibre rédox de l'ubiquinone a montré que l'enzyme n'était pas engagée en dessous de 40 à 50 % de réduction du *pool* d'ubiquinone. À l'inverse, l'activité de la voie des cytochromes augmentait linéairement avec la concentration en ubiquinone réduite, fonctionnant efficacement à des niveaux de réduction bien inférieurs à ceux requis par la voie alternative (Moore et al. 1988; Dry et al. 1989). Ces résultats confirmaient ainsi le modèle original de Bahr et Bonner (1973a,b). Dans la foulée, un modèle cinétique liant l'activité de l'AOX à l'équilibre rédox de l'ubiquinone a été développé par Moore et Siedow (1991). D'abord confirmé expérimentalement (Siedow et Moore 1993), il a ensuite été adapté en fonction de nouvelles observations (Ribas-Carbo et al. 1994).

De son côté, le groupe de Krab (1995) construisait un modèle où l'activité de l'AOX, considérée comme dépendante de la concentration en ubiquinone réduite, devait aussi dépendre indirectement de l'activité des autres enzymes en interaction avec le *pool* d'ubiquinone. Cette approche s'est révélée très performante puisqu'elle a permis d'expliquer une série d'observations particulières, telles que l'apparente préférence de l'AOX pour certains substrats respiratoires (*revue par* Affourtit et al. 2001). Toutefois, sa principale implication était de remettre en cause les études basées sur le modèle de Bahr et Bonner (1973a,b) et reposant sur l'utilisation d'inhibiteurs respiratoires. En effet, selon ce nouveau modèle, l'inhibition de l'AOX par le SHAM devait conduire à une élévation du niveau de réduction du *pool* d'ubiquinone, causant à son tour une augmentation de l'activité de la voie principale. Dans ce cas de figure, l'engagement de la voie alternative devait sans doute être considérablement sous-estimé (Krab 1995), prédiction effectivement vérifiée expérimentalement (van den Bergen et al. 1994).

tion en cyanure bloquant complètement la voie des cytochromes. L'activité de la voie alternative correspond pour sa part au flux respiratoire effectivement assuré par l'AOX. Jusqu'aux années 1990, l'activité (apparente) s'identifiait à la fraction de la respiration totale inhibée par le SHAM en absence de cyanure. Quant à l'engagement de la voie alternative, il s'agit du rapport de son activité sur sa capacité. C'est donc une fraction variant de 0 et 1 (*revue par* Moller et al. 1988; McIntosh 1994).

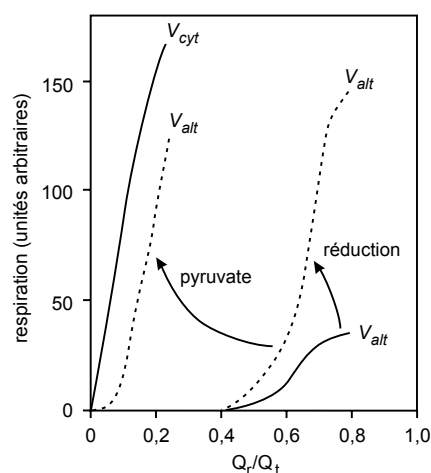


FIG. 2.1. Dépendance des activités respiratoires de la voie des cytochromes et de la voie alternative vis-à-vis de l'équilibre rédox de l'ubiquinone. Q_r/Q_t : ubiquinone réduite/totale. Lorsque l'AOX est réduite, elle dispose d'une plus grande capacité de capture des électrons. Dans cet état, elle devient par ailleurs sensible à la stimulation par le pyruvate (et d'autres α -cétoacides), ce qui lui permet de concurrencer la voie des cytochromes à de faibles niveaux de réduction du *pool* d'ubiquinone (*adapté de* Millenaar 2000).

Le coup de grâce au modèle de Bahr et Bonner (1973a,b) est finalement venu de la découverte des mécanismes d'activation post-traductionnelle de l'AOX (*voir* section 2.3.3) démontrant qu'en conditions réductrices et en présence de pyruvate, l'enzyme est capable de rivaliser avec la voie des cytochromes pour l'utilisation des électrons de l'ubiquinol (Figure 2.1; *revue par* Day et Wiskich 1995; Day et al. 1996). Ajoutés aux effets secondaires inhérents aux inhibiteurs respiratoires (*revue par* Moller et al. 1988), ces éléments ont mis en lumière la nécessité de recourir à de nouvelles techniques de mesure de l'activité de la voie alternative, telles que la discrimination isotopique vis-à-vis de l'oxygène (*revue par* Robinson et al. 1995) et la méthode ADP/O (*revue par* Sluse et Jarmuszkiewicz 1998).

2.3 Nature moléculaire de l'oxydase alternative

2.3.1 Structure de l'AOX

Chez *Sauromatum guttatum*, premier modèle de plante supérieure en ce qui concerne l'oxydase al-

ternative, l'AOX mature (c'est-à-dire débarrassée de son peptide signal) compte 286 acides aminés (Rhoads et McIntosh 1991). Le profil d'hydropathie de sa séquence peptidique indique que la majorité de la protéine est hydrophile, bien qu'elle comprenne deux régions hydrophobes, d'environ 20 résidus chacune, débutant approximativement à 110 et 170 acides aminés de l'extrémité N-terminale mature (Moore et Siedow 1991).

Le fait que l'AOX se comporte comme une protéine intégrale de la membrane mitochondriale interne a conduit à la suggestion que les domaines hydrophobes assuraient son ancrage en adoptant la forme de deux hélices α transmembranaires. Dans cette disposition, la majorité de la masse protéique baigne dans la phase aqueuse, du côté matriciel de la membrane interne, tandis qu'une région interhélicale d'environ 40 acides aminés relie les deux domaines transmembranaires en passant dans l'espace intermembranaire (Moore et Siedow 1991).

Plus récemment, la modélisation du site actif de l'AOX a montré que cette région interhélicale était requise pour former le centre dinucléaire de la protéine (voir section 2.3.2), fonction incompatible avec sa localisation dans l'espace intermembranaire. C'est la raison pour laquelle Andersson et Nordlund (1999) ont suggéré que l'AOX est une protéine membranaire interfaciale, analogue à la prostaglandine H2 synthase-1. Dans ce nouveau modèle, la région hydrophobe C-terminale, de même que la moitié des résidus de sa contrepartie N-terminale, sont arrimés dans la membrane mitochondriale interne par insertion dans la couche lipidique de la face matricielle (Figure 2.2).

2.3.2 Site actif de l'AOX

L'AOX catalyse la réduction de l'oxygène en eau par quatre électrons, mais se révèle une protéine plutôt simple sur le plan structural, l'unité fonctionnelle étant composée d'un unique polypeptide d'environ 32 kDa (Kumar et Soll 1992 ; Albury et al. 1996 ; Huh et Kang 1999).

Diverses propriétés ont rapidement suggéré la présence d'atomes de fer dans le site actif de l'AOX (revue par Siedow et Umbach 1995), mais les préparations d'enzyme partiellement purifiée n'ont jamais montré les caractéristiques spectroscopiques typiques des protéines comportant cet élément (Berthold et Siedow 1993). Quoiqu'inhabituelles pour une métalloprotéine, ces caractéristiques sont similaires à celles de la sous-unité hydroxylase de la mé-

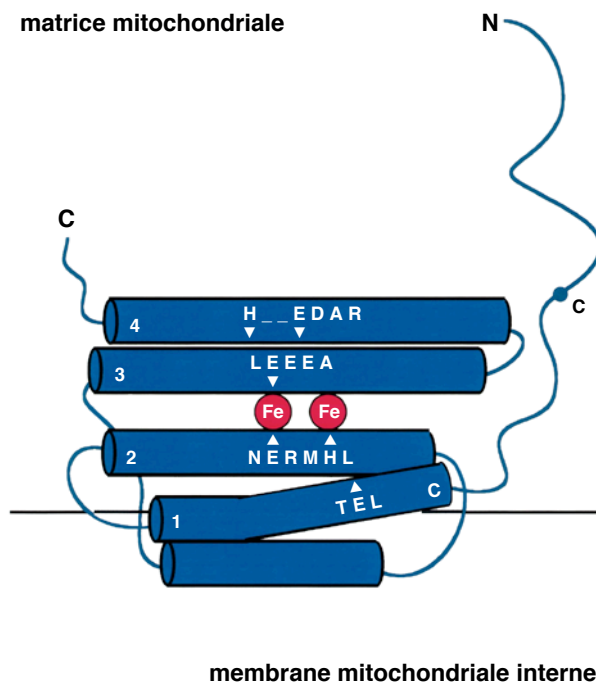


FIG. 2.2. Représentation schématique de la structure de l'AOX montrant les cinq hélices α et les positions relatives des deux atomes de fer et des principales régions conservées. Les six ligands présumés du centre dinucléaire sont marqués de triangles blancs. Les grands N et C désignent respectivement les extrémités N et C-terminales de la protéine, tandis que les petits C indiquent les deux cystéines conservées dans les séquences de plantes supérieures. Les quatre hélices α impliquées dans la formation du site actif sont numérotées (adapté de Andersson et Nordlund 1999 ; Berthold et al. 2000 ; Affourtit et al. 2002).

thane monooxygénase, une enzyme à site actif dinucléaire appartenant à la famille des *ribonucleotides reductases (RNR) R2-like proteins*. Un des traits distinctifs de cette classe de polypeptides est la présence de deux motifs EXXH, dans lesquels les résidus glutamate et histidine sont impliqués, avec le soutien de deux groupes carboxylates additionnels, dans la coordination des deux atomes de fer du site actif. Structuralement, les *RNR R2-like proteins* possèdent toutes un groupe de quatre hélices anti-parallèles disposées en deux paires. Le motif EXXH se retrouve sur les hélices 2 et 4, respectivement appariées aux hélices 1 et 3. Ces dernières comportent chacune l'un des deux autres résidus à groupe carboxylate nécessaires à la coordination (revue par Siedow et Umbach 2000 ; Joseph-Horne et al. 2001).

En examinant les rares séquences peptidiques disponibles en 1995, Siedow et al. ont noté la conservation de trois motifs EXXH dans toutes les AOXs. Sur cette base, ils ont proposé comme site actif un centre dinucléaire semblable à celui de la sous-unité hydroxylase de la méthane monooxygénase, ce qui permettait en outre d'expliquer les caractéristiques spectroscopiques particulières de l'AOX. Puisque le motif EXXH le plus proche de l'extrémité N-terminale (E217-X-X-H220; numérotation de l'AOX prématuration de *S. guttatum*) se situait dans la région interhélicale supposée à l'époque localisée du côté opposé de la membrane par rapport au centre catalytique, ces auteurs ont suggéré que les deux motifs EXXH les plus C-terminaux (E270-X-X-H273 et E319-X-X-H322) étaient ceux qui contribuaient effectivement au site actif (Siedow et al. 1995) et ont développé un modèle structural pour le centre dinucléaire (Figure 2.3, en haut à droite; Figure 2.4; Moore et al. 1995).

Avec l'arrivée de nouvelles séquences AOX, il est apparu que l'histidine H273 du motif EXXH central n'était pas toujours présente, en particulier chez les organismes non photosynthétiques, tandis que le motif EXXH N-terminal restait universellement conservé. Andersson et Nordlund (1999) ont alors combiné cette observation avec de nouvelles données relatives à la structure des *RNR R2-like proteins* pour développer un modèle alternatif du centre dinucléaire de l'AOX. Comme signalé plus haut, ce modèle implique l'élimination de la paire d'hélices α transmembranaires afin de positionner les deux motifs EXXH universellement conservés du côté matriciel de la membrane mitochondriale interne. Il postule par ailleurs l'existence de cinq hélices, dont quatre sont impliquées dans la formation du site actif. Selon ce modèle (Figures 2.2 et 2.3, en haut à gauche), l'espacement entre les résidus de la sphère de coordination primaire des deux atomes de fer est en meilleur accord avec les caractéristiques structurales des *RNR R2-like proteins* que dans le modèle de Moore et Siedow (Andersson et Nordlund 1999).

Récemment, il a été montré que le gène *IMMUTANS* d'*Arabidopsis thaliana* encode une protéine chloroplastique quelque peu apparentée à l'AOX (Wu et al. 1999; Carol et al. 1999). Cette oxydase terminale plastidiale (PTOX), associée aux membranes des thylakoïdes, couple l'oxydation de la plastoquinone réduite (plastoquinol) à la réduction de l'oxygène en eau et semble intervenir dans la chlororespiration (Josse et al. 2000; Cournac et al. 2000a,b, 2002). L'alignement des séquences de la PTOX et

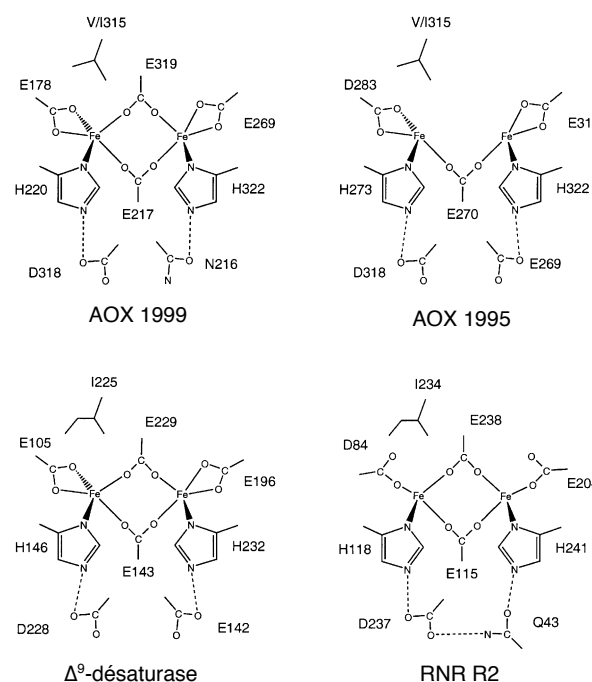
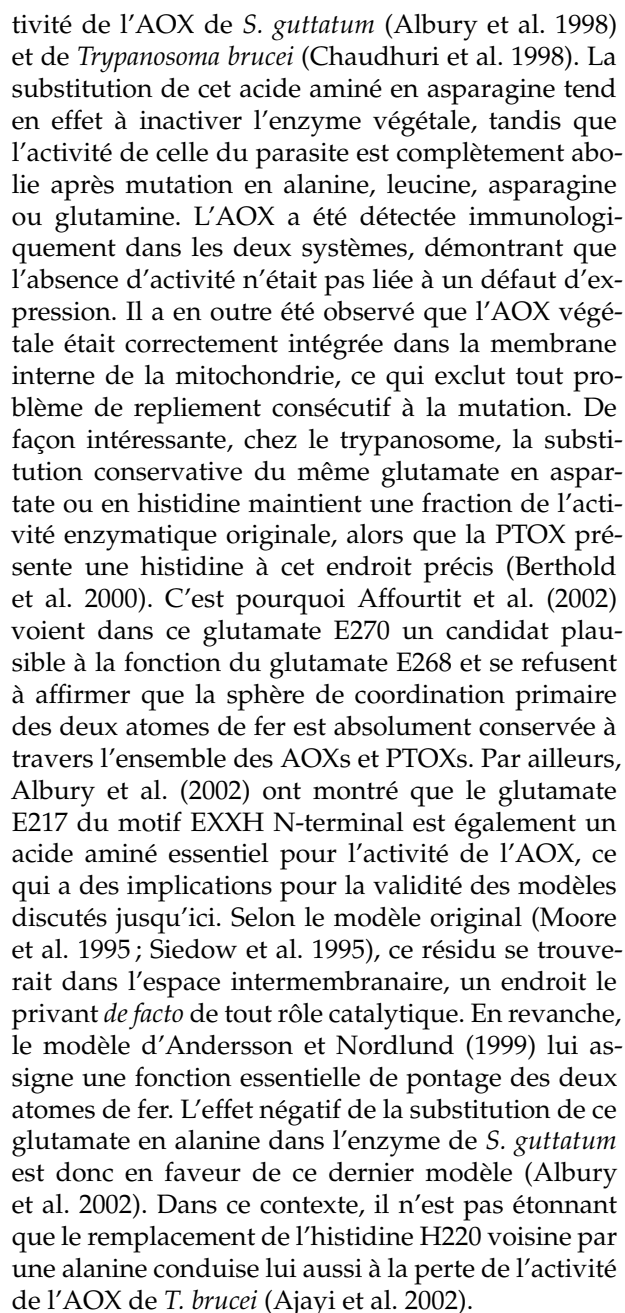


FIG. 2.3. Comparaison des sites actifs des deux modèles d'AOX avec ceux de la Δ^9 -désaturase et de la RNR R2. AOX 1995 (Siedow et al. 1995; Moore et al. 1995); AOX 1999 (Andersson et Nordlund 1999). La numérotation de la partie supérieure de la figure est celle de l'AOX prématuration de *S. guttatum*.

d'une quinzaine d'AOXs de sources variées révèle en effet la présence de 19 résidus conservés entre cette enzyme chloroplastique et ses homologues mitochondriales (à comparer aux 36 acides aminés conservés pour l'ensemble des protéines AOXs; Figure 2.4). Une observation frappante est que les résidus impliqués dans la formation du centre dinucléaire du modèle d'Andersson et Nordlund (1999) sont tous conservés dans la PTOX, à l'exception du glutamate E269 (Berthold et al. 2000). Or, dans toutes les AOXs, ce résidu fait partie d'un quintet séquentiel comprenant deux autres glutamates, à savoir E270 et E268. Puisque ce dernier est le seul acide aminé à groupe carboxylate également présent dans la PTOX, il pourrait être le résidu responsable de la coordination précédemment assignée au glutamate E269 (Berthold et al. 2000). L'intérêt majeur de cette suggestion est d'appréhender le site actif de deux enzymes à réactivité similaire à l'aide d'un seul modèle. Des études de mutagenèse dirigée avec expression hétérologue ont toutefois révélé que le glutamate E270 est un résidu clé pour l'ac-



L'application de la séquence de l'AOX à la structure tridimensionnelle de la Δ^9 -désaturase, une protéine de la même famille, a par ailleurs révélé une crevasse de 10 Å de long et de 5 Å de large, bordée d'une série de petits résidus hydrophobes hautement conservés. Il a dès lors été suggéré que cette région puisse constituer le site de liaison à l'ubiquinone (Andersson et Nordlund 1999). Un argument en faveur de cette hypothèse est fourni par le fait que deux des trois mutants de l'AOX d'*A. thaliana* moins sensibles au SHAM (Berthold 1998)

sont touchés dans des résidus proches de cette crevasse (Figure 2.4, résidus 259 et 263). Or, le SHAM est censé inhiber l'AOX par compétition avec l'ubiquinol (Moore et Siedow 1991). Pour plus de détails sur le site de liaison à l'ubiquinone et sur les mécanismes catalytiques proposés pour l'AOX, sujets qui dépassent manifestement le cadre de ce travail, le lecteur est invité à consulter les récentes revues de Berthold et al. (2000) et Affourtit et al. (2002).

2.3.3 Activation post-traductionnelle de l'AOX

Il est établi depuis longtemps que l'activité de l'AOX *in vivo* dépend à la fois de la quantité de protéine disponible et de la concentration de son substrat, l'ubiquinone réduite (revue par Moore et Siedow 1991; Day et Wiskich 1995). Toutefois, au cours de la dernière décennie, deux nouveaux mécanismes régulateurs interconnectés ont été mis en évidence *in vitro* dans les mitochondries isolées de plantes supérieures. Chez celles-ci, l'AOX existe sous une forme homodimérique provenant de l'association de deux monomères par des liaisons non covalentes. Le premier de ces mécanismes est de type rédox et repose sur la présence ou l'absence d'un pont disulfure pouvant se former entre les deux sous-unités de l'homodimère. Lorsque les monomères sont liés par ce pont disulfure, l'enzyme est dite à l'état oxydé et se révèle inactive (Umbach et Siedow 1993). À l'inverse, lorsque le pont disulfure est réduit, l'AOX est légèrement plus active, les monomères restant associés de manière non covalente. Dans cet état, l'enzyme répond alors à une activation allostérique (deuxième mécanisme) impliquant les α -cétoacides (Figure 2.1). Ces derniers, dont le plus efficace est le pyruvate, se doivent d'être présents pour assurer l'activité maximale de l'AOX (Millar et al. 1993; Day et al. 1994; Umbach et al. 1994; Vanlerberghe et al. 1999).

L'unique acide aminé responsable de ces deux mécanismes régulateurs a été identifié par mutagenèse dirigée de l'AOX d'*A. thaliana* (Rhoads et al. 1998) et du tabac (Vanlerberghe et al. 1998). Il s'agit de la plus N-terminale des deux cystéines conservées dans les séquences AOX de plantes supérieures (Figure 2.2). La réponse de l'activité de l'AOX de soja aux agents porteurs d'un groupement sulfhydryle suggère en outre que l'interaction des α -cétoacides avec la cystéine régulatrice prend la forme d'un thiohémiacétal dans lequel le carbonyle de l' α -cétoacide se lie au soufre du groupe-

ment sulfhydryle de la cystéine. Une telle association a pour effet d'introduire un groupe carboxylate chargé négativement à cet endroit de la protéine (Umbach et Siedow 1996). Un argument en faveur de ce mécanisme est fourni par des mutants de l'AOX d'*Arabidopsis* où la cystéine régulatrice a été remplacée par un résidu glutamate (Rhoads et al. 1998) ou aspartate (Umbach et al. 2002) introduisant une charge négative permanente. Dans les deux cas, la protéine modifiée (exprimée dans les membranes d'*E. coli*) est active dans toutes les conditions et ne requiert plus la présence d'un α -cétoacide pour atteindre de hauts niveaux d'activité.

L'importance de ces mécanismes régulateurs pour le fonctionnement de l'AOX *in vivo* ne fait pas l'objet d'un consensus (voir section 2.5.1), mais il est manifeste qu'ils affectent profondément l'activité de l'AOX dans les systèmes *in vitro* (Umbach et al. 1994; Vanlerberghe et al. 1999). Ainsi, lorsque des mitochondries isolées de soja (Day et al. 1994) ou des extraits enzymatiques d'*A. italicum* (Hoefnagel et al. 1997) sont débarrassés de leur pyruvate endogène, l'activité de l'AOX n'est plus détectable. De même, en dépit de la réduction de sa cystéine régulatrice, l'activité de l'AOX d'*A. thaliana* exprimée dans *E. coli* reste faible tant que du pyruvate n'a pas été ajouté au milieu d'incubation (Rhoads et al. 1998). Cette dépendance de l'activité de l'AOX vis-à-vis des α -cétoacides a conduit à la suggestion que ces derniers pourraient directement prendre part au mécanisme catalytique (Hoefnagel et al. 1997), peut-être par le biais de la déprotonation de l'ubiquinol (Umbach et Siedow 1996).

Deux protéines AOX, l'une de riz (Ito et al. 1997) et l'autre de tomate (Djajanegara et al. 1999), comportent une sérine en lieu et place de la cystéine régulatrice conservée dans la majorité des séquences de plantes supérieures. Quoique ces protéines n'aient pas été examinées en tant que telles, des AOXs d'*A. thaliana* ou de soja dans lesquelles une sérine ou une alanine ont été introduites par mutagenèse dirigée se révèlent insensibles aux α -cétoacides. Par contre, ces enzymes modifiées sont activables par le succinate, un acide dicarboxylique (Djajanegara et al. 1999; Umbach et al. 2002). S'il est impossible de former un thiohémiacétal avec ces résidus dépourvus de groupe sulfhydryle, une liaison hydrogène entre le succinate et la sérine pourrait néanmoins introduire une charge négative à la manière du thiohémiacétal formé entre le pyruvate et la cystéine, comme c'est le cas avec son remplacement par le glutamate (Umbach et al. 2002). Il reste-

rait alors à expliquer le mécanisme d'activation des AOXs porteuses d'une alanine au site régulateur.

Plus récemment, Umbach et al. (2002) ont introduit de nouvelles substitutions dans l'AOX d'*A. thaliana* afin de clarifier le rôle des α -cétoacides. Il ressort de ces travaux que les enzymes présentant un résidu chargé positivement (lysine ou arginine) à la place de la cystéine régulatrice sont insensibles au pyruvate et au succinate, mais se révèlent plus actives en l'absence de pyruvate que les AOXs de type sauvage ou bien comportant une sérine ou une alanine. À l'inverse, les substitutions non chargées (glutamine ou leucine) conduisent à une enzyme inactive, sans doute *via* l'établissement de liaisons hydrophobes entre les monomères ayant pour conséquence de rigidifier l'ensemble à la façon du pont disulfure oxydé. Cela indique que l'activation de l'AOX par les α -cétoacides pourrait être liée à des changements conformationnels causés par la répulsion de charges entre les deux sous-unités de l'homodimère d'AOX plutôt qu'à un rôle direct de ces derniers dans le mécanisme catalytique. Par ailleurs, tant l'enzyme sauvage que les enzymes mutées au site régulateur voient leur activité stimulée par le glyoxylate, suggérant ainsi l'existence d'un autre site d'activation. Bien que celui-ci corresponde vraisemblablement à la seconde cystéine conservée, la signification physiologique de cet effet est encore plus sujette à caution dans la mesure où cette stimulation nécessite des concentrations millimolaires de glyoxylate, alors que la moitié de l'effet maximal du pyruvate est déjà dépassée à 5 μ M. Signalons enfin qu'aucune de ces substitutions ne modifie la structure dimérique de l'AOX.

La régulation de l'activité de l'AOX chez les autres organismes n'est pas aussi bien caractérisée que chez les plantes supérieures. Il a toutefois été rapporté que les nucléotides de purine, en particulier l'ADP, l'AMP et le GMP, stimulent son activité chez plusieurs champignons (Vanderleyden et al. 1980; Michea-Hamzehpour et Turian 1987; Sakajo et al. 1997) et chez un protozoaire (Jarmuszkiewicz et al. 1997). En fait, dans certaines conditions, l'activité de l'AOX est même presque complètement dépendante de la présence de ces composés (Vanderleyden et al. 1980; Jarmuszkiewicz et al. 1997; Umbach et Siedow 2000). Le mode d'action des nucléotides de purine reste cependant à déterminer. Quoique la réponse des AOXs fongiques aux α -cétoacides n'ait pas été étudiée systématiquement, aucun effet n'a été identifié chez *Magnaporthe grisea* (Yukioka et al. 1998) et *Tapesia acutiformis* (Joseph-

Horne et al. 2000), de même que chez *Pichia stipitis* et *Neurospora crassa* (Umbach et Siedow 2000). Le succinate n'a en outre pas d'influence sur l'activité de l'AOX chez ces deux derniers (Siedow et Umbach 2000). De plus, à l'exception notable et controversée de *Gaeumannomyces graminis* (Joseph-Horne et al. 1998), tous les champignons examinés jusqu'ici présentent une AOX monomérique. En la matière, l'AOX des champignons est donc nettement différente de celle des plantes supérieures, où elle est toujours dimérique (*revue par* Siedow et Umbach 2000; Joseph-Horne et al. 2001; Affourtit et al. 2002).

2.3.4 Domaines régulateurs de l'AOX

Les bases structurales des différences d'activation post-traductionnelle observées entre les AOXs de plantes supérieures et de champignons n'ont pas encore été établies. La comparaison des séquences végétales et fongiques disponibles à ce jour indique qu'il existe une variabilité considérable entre les deux règnes dans la région N-terminale de la protéine, et ce indépendamment de la présence du peptide signal (Umbach et Siedow 2000). Au sein de cette région, les AOXs de plantes supérieures présentent un bloc hautement conservé d'environ 40 acides aminés qui comprend la cystéine régulatrice discutée plus haut. Les séquences fongiques commencent à s'aligner avec les séquences végétales juste après ce bloc, environ 30 résidus en amont de la première région hydrophobe. Hormis une insertion de 20 à 25 acides aminés située juste avant cette première région hydrophobe et une extension C-terminale de 20 à 50 résidus, toutes deux spécifiques aux AOXs de champignons, les séquences végétales et fongiques sont très similaires dans leurs deux derniers tiers (Figure 2.5). Cette région d'homologie entre les deux groupes d'AOXs correspond précisément à la partie de la protéine nécessaire à la formation du site actif de l'enzyme.

Au vu de la nature dimérique des AOXs de plantes supérieures et de l'apparente nature monomérique de la plupart des enzymes fongiques examinées jusqu'à présent, Umbach et Siedow (2000) ont proposé que le domaine de 40 acides aminés spécifique aux séquences végétales intervienne dans la dimérisation de la protéine. Cette région comprenant la cystéine régulatrice pourrait être en outre responsable de l'effet activateur des α -cétoacides observé chez les plantes supérieures. La nature monomérique de l'enzyme fongique et son insensibilité aux α -cétoacides s'expliqueraient dès

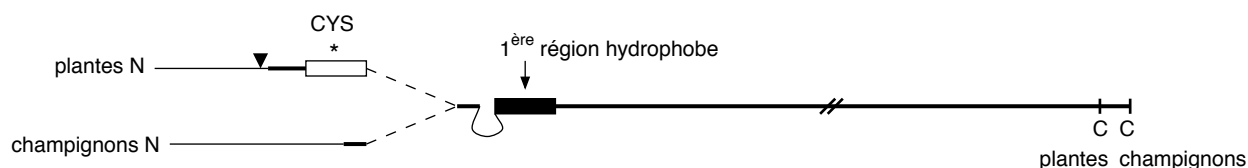


FIG. 2.5. **Représentation schématique de l'alignement de 15 AOXs végétales avec 6 AOXs fongiques.** Les extrémités des régions N-terminales (traits fins) sont les plus variables entre les deux groupes de séquences. Le site de clivage des deux AOXs matures connues chez les plantes supérieures est symbolisé par un triangle sur pointe. À partir de cette position, les AOXs végétales commencent à converger (trait plus épais). Les séquences de plantes supérieures deviennent très similaires au niveau du domaine de 40 acides aminés qui inclut la cystéine régulatrice (rectangle blanc surmonté d'une astérisque). Ce bloc est absent des séquences de champignons. Celles-ci commencent à se ressembler environ 70 à 75 résidus en amont de la première région hydrophobe (trait plus épais). Approximativement 30 acides aminés en amont de cette même région hydrophobe, les AOXs des deux groupes commencent à converger (traits interrompus obliques), puis deviennent clairement homologues, à l'exception d'un insert de 20 à 25 résidus (boucle vers le bas) et d'une extension C-terminale spécifiques aux champignons (*adapté de Umbach et Siedow 2000*).

lors par l'absence de ce domaine dans les AOXs de champignons. En effet, quoique les séquences fongiques contiennent plusieurs cystéines en amont de la première région hydrophobe, aucune n'apparaît homologue de la cystéine régulatrice des AOXs végétales (Umbach et Siedow 2000). Un autre domaine de dimérisation a par ailleurs été suggéré par Andersson et Nordlund (1999) au cours de leur modélisation de l'AOX. Dans ce modèle, la première région hydrophobe appartiendrait au groupe de quatre hélices entourant le centre dinucléaire, tandis que la seconde région hydrophobe serait soit un domaine d'insertion membranaire, soit un domaine de dimérisation de la protéine. Puisque les séquences de plantes supérieures et de champignons sont très similaires au niveau de cette seconde région hydrophobe, il semble peu probable qu'elle soit effectivement impliquée dans la dimérisation de l'AOX végétale (Umbach et Siedow 2000). En ce qui concerne la région de l'enzyme fongique responsable de la réponse aux nucléotides de purine, elle pourrait correspondre à l'un des deux domaines spécifiques aux champignons, à savoir l'insert de 20 à 25 résidus ou l'extension C-terminale (Siedow et Umbach 2000).

Bien que l'alignement de la protéine IMMUTANS avec les AOXs végétales et fongiques révèle une excellente conservation des résidus impliqués dans la coordination des deux atomes de fer proposés par Andersson et Nordlund (1999), il montre également que cette protéine chloroplastique (PTOX) ne présente aucune homologie avec le domaine régulateur des AOXs de plantes supérieures ou avec la région N-terminale des séquences de champignons, en ce compris l'insert spécifique à ces derniers (Umbach et Siedow 2000).

2.4 Génétique de l'oxydase alternative

2.4.1 Gènes *Aox*

Les premières études consacrées aux bases génétiques de la voie alternative ont été menées chez le champignon ascomycète *Neurospora crassa*. Elles ont montré que l'AOX y était encodée par un seul gène nucléaire (*aod-1*), tandis qu'un second gène nucléaire (*aod-2*) encodait probablement une protéine régulatrice (Bertrand et al. 1983). Les anticorps dirigés contre l'AOX de *S. guttatum* ont par la suite confirmé cette hypothèse en démontrant respectivement la présence et l'absence de la protéine chez des mutants *aod-1* et *aod-2* (Lambowitz et al. 1989). Chez *Pichia anomala*, un autre ascomycète, l'induction de la voie alternative par l'antimycine A est corrélée à l'apparition d'un unique polypeptide de 36 kDa. Identifiée à l'aide des mêmes anticorps, cette protéine a permis l'isolement du cDNA correspondant (Sakajo et al. 1991, 1993). En octobre 2001, les autres espèces fongiques pour lesquelles des séquences *Aox* étaient disponibles dans les banques de données se limitaient à *Aspergillus niger* (Kirimura et al. 1999), *Magnaporthe grisea* (Yukioka et al. 1998; Joseph-Horne et al. 2000), *Candida albicans* (Huh et Kang 1999, 2001) et *Ajellomyces capsulatus* (GenBank AF133236 et AF133237), alors qu'il existait des séquences partielles pour *Botrytis cinerea*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani*, *Stagonospora nodorum* et *Tapesia acuformis* (Joseph-Horne et al. 2000). Un an plus tard, GenBank fournit une douzaine de nouvelles séquences issues

de champignons, parmi lesquels *Aspergillus fumigatus* (AY081056), *Aspergillus nidulans* (AY140654), *Blumeria graminis* (AF327336), *Cryptococcus neoformans* (AF502293), *Gelasinospora* sp. (AY140655), *Monilinia fructicola* (AF420306), *Pichia stipitis* (AY004212), *Podosporea anserina* (AF321004), *Venturia inaequalis* (AF363785) et *Yarrowia lipolytica* (AL410643).

Chez les plantes supérieures, l'isolement, en 1991, du cDNA *Aox1* de *S. guttatum* (Rhoads et McIntosh) a été suivi l'année suivante du clonage de son homologue chez *A. thaliana*, par complémentarisation d'une souche d'*E. coli* à la respiration déficiente. Kumar et Soll (1992) ont en effet identifié chez ce mutant *hemA* des cellules devenues capables de croître en conditions aérobies consécutivement à l'insertion d'un cDNA *Aox1* d'*A. thaliana*. La respiration des bactéries complémentées s'est avérée résistante au cyanure et sensible au SHAM. Depuis lors, les cDNAs et/ou les gènes *Aox* de toute une série de plantes supérieures ont été caractérisés, généralement par amplification à l'aide d'amorces dégénérées localisées dans des segments conservés de l'AOX et/ou par criblage de diverses banques cDNA, EST ou génomiques.

Les premiers travaux ont d'abord suggéré que l'AOX était encodée par un seul gène chez de nombreuses espèces. Aujourd'hui, il est admis qu'une petite famille multigénique existe au moins chez l'arabette des dames (*A. thaliana*; Kumar et Soll 1992; Saisho et al. 1997), le soja (*Glycine max*; Whelan et al. 1993, 1996), le tabac (*Nicotiana tabacum*; Vanlerberghe et McIntosh 1994; Whelan et al. 1995, 1996), le riz (*Oryza sativa*; Ito et al. 1997) et le mangouier (*Mangifera indica*; Cruz-Hernandez et Gomez-Lim 1995; Considine et al. 2001). À côté de *S. guttatum* (Rhoads et McIntosh 1991), les autres espèces végétales pour lesquelles une seule séquence *Aox* a été décrite sont la pomme de terre (*Solanum tuberosum*; Hiser et al. 1996), le blé (*Triticum aestivum*; AB078882), le dolique à œil noir (*Vigna unguiculata*; AJ319899), le maïs (*Zea mays*; AF040566), la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*; AB055060) et l'hybride de peuplier tremble et faux-tremble (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*; AJ251511). Enfin, les gènes *Aox* uniquement répertoriés dans des banques EST par Considine et al. (2002) concernent la ficoïde glaciale (*Mesembryanthemum crystallinum*), la luzerne (*Medicago* sp.), l'orge (*Hordeum vulgare*; quoiqu'il s'agisse probablement d'une contamination fongique) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*).

La plupart des séquences *Aox* de plantes supérieures décrites dans la littérature appartiennent au type *Aox1* (Figure 2.6). En 1996, le premier gène de type *Aox2* a été isolé chez le soja (Whelan et al. 1996), bientôt suivi de découvertes similaires chez le tabac (Whelan et al. 1996), *A. thaliana* (Saisho et al. 1997) et le mangouier (Considine et al. 2001).

La distance peptidique séparant les deux types d'AOXs n'est pas beaucoup plus importante que la variation existant entre les AOXs d'un même type. Ainsi, sur un segment de 40 acides aminés centré sur l'hélice α enfouie dans la membrane (voir Figure 2.2), les protéines AOX2a et AOX2b de soja sont identiques à 75 %, tandis que leur identité avec l'isoforme AOX1 varie de 64 à 70 % (Whelan et al. 1996). De même, chez *A. thaliana*, l'identité des isoformes AOX1a, AOX1b et AOX1c s'étend de 73 à 81 %, alors que leur identité avec la protéine AOX2 varie de 67 à 70 % (Saisho et al. 1997).

Il a par ailleurs été montré par discrimination isotopique que le changement d'un seul acide aminé peut avoir un effet important sur la capacité de la protéine à réagir avec l'oxygène. Dès lors, certaines isoformes d'AOX pourraient se révéler intrinsèquement plus ou moins compétitives vis-à-vis de la voie des cytochromes, et ce indépendamment de tout mécanisme d'activation post-traductionnelle (Finnegan et al. 1997; Umbach et al. 2002).

Récemment, Considine et al. (2002) ont tenté d'isoler de nouvelles séquences *Aox* chez une dizaine d'espèces de plantes supérieures, en combinant analyse de banques (EST et génomiques) et PCR à l'aide d'amorces dégénérées. Bien qu'ils aient

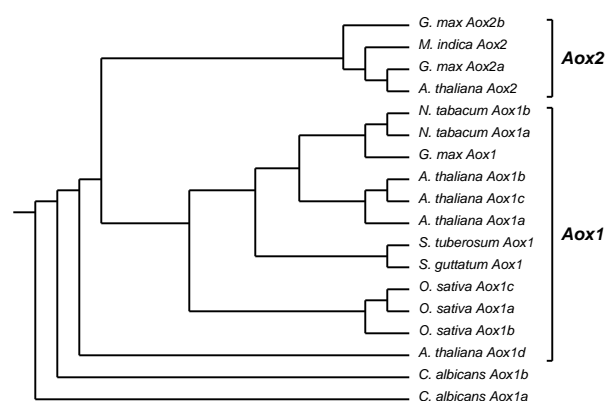


FIG. 2.6. Phénogramme de 16 séquences AOX de plantes supérieures et de 2 séquences de *C. albicans*. L'alignement ne comprenait que des protéines matures et complètes (adapté de Considine et al. 2002).

identifié toute une série de nouveaux gènes *Aox1*, il ressort de leur étude que les séquences de type *Aox2* sont totalement absentes des cinq monocotylées étudiées jusqu'ici, alors qu'elles se retrouvent chez six des neuf dicotylées examinées. La distribution des gènes *Aox2* entre les différents ordres de dicotylées indique en outre que leur absence chez ces trois espèces relève probablement du manque de données.

À côté des plantes supérieures et des champignons, l'existence de la voie alternative a été démontrée chez d'autres organismes, tels que des algues et des protistes (revue par Moore et Siedow 1991). Toutefois, à l'exception de *Chlamydomonas reinhardtii* (voir chapitre 3, section 3.3.2), du trypanosome africain (*Trypanosoma brucei*; GenBank AB070614 et AB070617) et de l'amibe *Dictyostelium discoideum* (AB046418), aucun d'entre eux n'a encore livré de séquences *Aox* à l'heure actuelle.

2.4.2 Expression des gènes *Aox*

Au sein des mitochondries végétales, la capacité de la voie alternative peut varier d'à peine quelques pourcents de la respiration totale (tubercules de pomme de terre; Hiser et McIntosh 1990) à près de 100% (spadices de *S. guttatum*; Elthon et al. 1989a). Dans les organes dits thermogéniques, comme l'inflorescence des Aracées, il est bien connu que la voie alternative intervient dans la production de chaleur. Ainsi, le jour de l'anthèse de *S. guttatum*, la température du spadice s'élève de 9 à 12°C au-dessus de la température ambiante, ce qui permet la volatilisation de composés odorants attractifs pour les insectes pollinisateurs. Cette augmentation de température est causée par un accroissement considérable de respiration par la voie alternative, dont la capacité est décuplée entre l'avant-veille et la veille de l'anthèse. Le signal déclencheur de ce phénomène, autrefois appelé calorigène, a été identifié depuis lors comme étant l'acide salicylique. Cette molécule migre en effet vers le sommet du spadice la veille de l'anthèse pour y provoquer le lendemain la thermogénèse. À lui seul, l'acide salicylique exogène est également capable d'induire la voie alternative (Elthon et al. 1989a; Rhoads et McIntosh 1992).

Dès 1987, Elthon et McIntosh ont montré que la montée en capacité de la voie alternative dans l'inflorescence thermogénique de *S. guttatum* est corrélée à l'apparition de protéines AOX de 35 et 36 kDa détectables immunologiquement. Le phénomène repose en fait principalement sur l'activation transcriptionnelle du gène *Aox1* (Rhoads et McIn-

tosh 1992). L'analyse détaillée de sa région promotrice a par ailleurs révélé l'existence d'éléments conservés similaires à ceux de certaines protéines PR (pour *pathogenesis-related*) du tabac, impliquées dans les réponses aux attaques de pathogènes et dont l'expression est elle aussi contrôlée par l'acide salicylique (Rhoads et McIntosh 1993).

En dehors du cas particulier de l'anthèse de *S. guttatum*, il semble aujourd'hui que l'expression des gènes de type *Aox1* soit généralement stimulée par les conditions de stress environnemental, alors que celle des gènes de type *Aox2* (apparemment spécifiques aux dicotylédones) paraît constitutive ou modulée par le stade de développement (Considine et al. 2002). Ainsi, chez le soja, le gène *Aox1* n'est exprimé qu'après traitement à l'antimycine A, à l'acide salicylique ou au froid (Whelan et al. 1996; Finnegan et al. 1997; McCabe et al. 1998; Tanudji et al. 1999; Considine et al. 2002). À l'inverse, les gènes *Aox2a* et *Aox2b* de la même espèce sont insensibles à ces conditions de stress, mais présentent une spécificité tissulaire. De même, chez *A. thaliana*, divers inhibiteurs respiratoires induisent l'expression du gène *Aox1a*, alors que le gène *Aox2* n'est exprimé qu'au cours de la germination de la graine (Saisho et al. 1997, 2001a,b). Enfin, chez le manguier, les deux types de gènes s'expriment dans le fruit, mais le messager *Aox2* est surtout transcrit au début du développement de la mangue, tandis que les gènes *Aox1a* et *Aox1b* sont plutôt exprimés à la fin de son mûrissement, stade potentiellement générateur de stress oxydant (Considine et al. 2001).

Comme nous venons de le signaler, beaucoup de conditions de stress environnemental sont connues pour stimuler (voire induire) la transcription des gènes *Aox1* et/ou l'accumulation de la protéine correspondante. Il s'agit entre autres du stress salin (Hilal et al. 1998), de l'exposition au froid (Vanlerberghe et McIntosh 1992b; Ito et al. 1997; Gonzalez-Meler et al. 1999), aux pathogènes (Simons et al. 1999) et aux métaux lourds (Padua et al. 1999), de l'inhibition de la synthèse protéique mitochondriale (Zhang et al. 1996), de la restriction chimique ou génétique de la voie des cytochromes (Vanlerberghe et McIntosh 1992a, 1994; Saisho et al. 1997; Wagner et Wagner 1997; Tanudji et al. 1999; Ducos et al. 2001), de la carence phosphatée (Gonzalez-Meler et al. 2001) et de l'incubation en présence de métabolites tels que l'acétate, la cystéine et les acides salicylique et citrique (Elthon et al. 1989a; Rhoads et McIntosh 1992; Vanlerberghe et McIntosh 1996; Lennon et al. 1997; Potter et al. 2000).

Parmi ces situations, nombreuses sont celles susceptibles de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment par la perturbation des fonctions mitochondriales (*revue par* Wagner et Moore 1997). Malgré des données plutôt disparates, la plupart des auteurs s'accordent sur une production de ROS (O_2^- et H_2O_2) dans les mitochondries végétales au moins égale à celle des mitochondries animales, les sites majeurs de fuite d'électrons étant le FMN du complexe I et l'ubisemiquinone du complexe III (*voir* chapitre 1, Figures 1.1 et 1.2). De plus, lorsque la chaîne de transport d'électrons est globalement réduite, par exemple en cas d'altérations des membranes par le froid, de limitation en ADP ou en Pi (*state 4*) ou encore d'inhibition du complexe III par l'antimycine A, la génération de ROS augmente spectaculairement (*revue par* Moller 2001). Ces observations ont amené l'hypothèse selon laquelle les ROS seraient impliquées dans la transduction d'un signal de la mitochondrie vers le noyau (Minagawa et al. 1992; Wagner 1995). L'enzyme induite aurait alors pour rôle d'évacuer les électrons stagnant sur la chaîne de transport mitochondriale afin de réduire la production d'espèces moléculaires délétères (Purvis et Shewfelt 1993).

Depuis lors, les résultats expérimentaux en faveur de cette hypothèse se sont accumulés. Ainsi, il a été démontré que l'addition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à des cellules de pétunia (Wagner 1995) et de tabac (Vanlerberghe et McIntosh 1996) déclenche la synthèse d'AOX et l'apparition de la respiration alternative. Par ailleurs, l'inhibition de l'AOX à l'aide de SHAM ou de PG stimule la production d' H_2O_2 dans les mitochondries isolées de pois et de soja (Popov et al. 1997). Enfin, des cellules de tabac transgénique dépourvues d'AOX (Vanlerberghe et al. 1994) génèrent bien plus d' H_2O_2 en présence d'antimycine A que des cellules de type sauvage, alors que des cellules où l'AOX est artificiellement surexprimée présentent pour leur part des niveaux d' H_2O_2 à peine détectables (McIntosh et al. 1998; Maxwell et al. 1999). La lignée sans voie alternative produit en outre davantage d' H_2O_2 en carence phosphatée, de même que durant le pic de respiration qui suit son réapprovisionnement en Pi (Parsons et al. 1999; Yip et Vanlerberghe 2001).

Il semblerait néanmoins que les ROS ne soient pas la seule voie de signalisation menant à l'expression de la voie alternative en conditions de stress. Ainsi, chez le soja, le citrate déclenche bien la transcription du gène *Aox1*, mais sa présence ne génère pas de ROS et son action est neutralisée par la stauro-

sporine, un inhibiteur des protéines kinases. En revanche, l'induction du même gène par l'antimycine A s'accompagne effectivement de la production de ROS et se révèle insensible à la staurosporine. Ces observations suggèrent qu'à côté des ROS, il existe au moins une seconde voie de transduction du signal, impliquant la phosphorylation de protéines non identifiées (Djajanegara et al. 2002).

Chez les champignons, les conditions d'induction de la voie alternative ne sont pas fondamentalement différentes de celles décrites pour les plantes supérieures (*revue par* Joseph-Horne et al. 2001). Il s'agit principalement de la restriction chimique ou génétique de la voie des cytochromes (Lambowitz et al. 1989; Sakajo et al. 1991; Minagawa et al. 1992; Li et al. 1996; Yukioka et al. 1998; Huh et Kang 1999, 2001), bien qu'une régulation par la source de carbone (Sakajo et al. 1991; Huh et Kang 2001) ou le stade de développement (*revue par* Joseph-Horne et al. 2001) ait été occasionnellement décrite. Les ROS semblent en outre clairement impliquées dans la voie de transduction du signal depuis la mitochondrie jusqu'au noyau (Minagawa et al. 1992; Yukioka et al. 1998; Huh et Kang 2001).

2.5 Régulation et rôle de la voie alternative

2.5.1 Régulation de la voie alternative

Nous avons vu antérieurement que chez les plantes supérieures, l'activité de la voie alternative est sous le contrôle de quatre facteurs distincts :

- ▷ l'abondance de la protéine AOX;
- ▷ l'état redox de son pont disulfure;
- ▷ son statut allostérique (gouverné par le pyruvate et d'autres α -cétoacides);
- ▷ la concentration en son substrat, l'ubiquinone réduite (ubiquinol).

L'abondance de la protéine dépend directement de la transcription du ou des gène(s) *Aox*, elle-même généralement accrue en conditions de stress et lorsque le transfert des électrons par la voie des cytochromes est d'une manière ou d'une autre compromis (*voir* section 2.4.2). En ce qui concerne les équivalents réducteurs responsables de la réduction du pont disulfure, ils sont apparemment dérivés du NADPH, résultant lui-même d'une activité accrue du cycle TCA, probablement par le biais de la NADPH:isocitrate déshydrogénase localisée

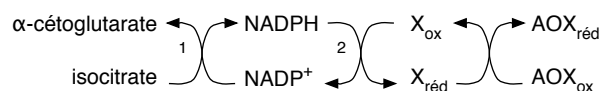


FIG. 2.7. Mécanisme putatif de réduction de l'AOX dans les mitochondries de plantes supérieures. 1: NADPH:isocitrate déshydrogénase; 2: thiorédoxine ou glutathion réductase; X: thiorédoxine ou glutathion; ox: oxydé; réd: réduit (*adapté de Day et Wiskich 1995*).

dans la matrice (Figure 2.7). L'identité de ces équivalents n'a pas encore été déterminée, mais il pourrait s'agir de thiorédoxine et/ou de glutathion, deux molécules à groupe sulfhydryle dont la présence a été démontrée dans les mitochondries de plantes supérieures (*revue par Day et Wiskich 1995; McIntosh et al. 1998; Mackenzie et McIntosh 1999*). De même, l'activation allostérique de l'AOX dépend de la concentration en α -cétoacides, et notamment en pyruvate. Celui-ci est situé à un véritable carrefour métabolique qui interconnecte entre autres la glycolyse, le cycle TCA, les voies de fermentation et la synthèse d'acides aminés. À l'instar de l'état rédox du pool d'ubiquinone reflétant la relative difficulté de la chaîne de transport mitochondriale à consommer la quantité d'équivalents réducteurs disponibles, l'abondance du pyruvate intègre en un seul point l'état du flux de carbone respiratoire (*revue par Vanlerberghe et McIntosh 1997*). Dès lors, les quatre facteurs à la base de la régulation de la voie alternative pourraient en fait agir de concert pour activer l'AOX lorsque la charge énergétique de la mitochondrie est trop élevée et/ou que la voie des cytochromes connaît des problèmes de saturation ou d'inhibition.

Toutefois, il n'est pas certain que tous ces mécanismes soient effectivement fonctionnels dans la plante. Ainsi, les études qui ont examiné l'état rédox de l'AOX ont montré qu'*in vivo*, celle-ci se trouve presque exclusivement à l'état réduit (sous forme activable par les α -cétoacides; voir section 2.3.3). De plus, il apparaît que la concentration en pyruvate au sein de la matrice mitochondriale dépasse nettement le seuil de 5 μM correspondant à la moitié de l'effet stimulateur maximal (*revue par Millenaar 2000; Siedow et Umbach 2000*).

2.5.2 Rôle de la voie alternative

Pour ce qui concerne le rôle physiologique de la voie alternative, on peut considérer que sa fonction thermogénique observée dans les inflorescences d'Ara-

cées est une spécialisation, voire un détournement, d'une fonction plus générale. En effet, bien que l'AOX existe chez toutes les plantes supérieures examinées jusqu'ici, aucune élévation de température ne se manifeste dans les organes où son activité est avérée. Par ailleurs, une large variété d'organismes à l'histoire plus ancienne que celle des plantes supérieures sont eux aussi équipés de cette enzyme. Ce sont là deux indices d'un rôle important dans le métabolisme cellulaire, et ce en dehors de toute production de chaleur (*revue par Millenaar 2000*).

Jusqu'au début des années 1990, il était largement admis que la voie alternative n'entraînait en action que lorsque la voie des cytochromes était saturée ou inhibée. Cette conviction se fondait sur les travaux de Bahr et Bonner (1973a,b) et avait conduit Lambers (1982) à postuler pour l'AOX une fonction de trop-plein énergétique (*energy overflow hypothesis*) permettant d'activer la respiration en conditions d'accumulation des glucides dans les tissus. À la même époque, d'autres auteurs voyaient dans la voie alternative la possibilité de découpler les fonctions cataboliques des fonctions anaboliques de la glycolyse et du cycle TCA en assurant la réoxydation des équivalents réducteurs (NAD^+) en dépit d'une charge énergétique élevée (*state 4; revue par McIntosh 1994; Mackenzie et McIntosh 1999*).

La découverte de nouveaux régulateurs de la voie alternative, au-delà de l'abondance de l'AOX et de l'équilibre rédox de l'ubiquinone, n'a pas pour autant éliminé ces hypothèses. Au contraire, la réduction du pont disulfure et l'activation allostérique de l'enzyme des plantes supérieures sont des mécanismes complémentaires susceptibles d'entrer en action précisément en cas de saturation ou d'inhibition de la voie des cytochromes, lorsque les équivalents réducteurs commencent à s'accumuler et que le pyruvate n'est plus consommé assez rapidement (*revue par Day et al. 1996*). Dès lors, la fonction la plus générale de la voie alternative serait d'harmoniser le métabolisme du carbone et l'activité de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. En effet, des fluctuations dans l'un ou l'autre de ces processus pourraient être compensées par la régulation post-traductionnelle de l'AOX, tandis que les tendances à plus long terme, menant à un déséquilibre persistant, seraient contrôlées par l'induction transcriptionnelle d'un ou plusieurs gènes *Aox* (Vanlerberghe et McIntosh 1997).

C'est dans ce cadre que s'inscrit le rôle supposé de l'AOX dans la prévention de la génération de ROS par la chaîne de transport d'électrons mitochon-

driale, de même que sa plausible contribution au maintien du flux de carbone respiratoire au travers de la glycolyse et du cycle TCA. À côté de ces deux fonctions discutées précédemment, la voie alternative pourrait également servir à maîtriser la concentration en pyruvate dans le but d'éviter la production d'éthanol par fermentation aérobie (Vanlerberghe et al. 1995, 1997).

Le maintien du flux d'électrons dans la mitochondrie est en outre indispensable lorsque la voie des cytochromes est altérée *in vivo*. Ainsi, le monoxyde d'azote (oxyde nitrique), un inhibiteur du complexe IV surtout efficace sous faible pression partielle en oxygène, pourrait jouer un rôle physiologique important (Millar et Day 1997). Synthétisé à partir de l'arginine par la NO synthase, il peut aussi résulter de la réduction incomplète du nitrite sous l'effet d'une activité secondaire de la nitrate réductase. Cette connexion avec la voie d'assimilation du nitrate implique que le moindre ralentissement de la réduction du nitrite en ammonium par la nitrite réductase (par exemple à la suite d'un déficit photosynthétique) menant à l'accumulation de nitrite peut se solder par la production de NO (revue par Yamasaki et al. 1999 ; Yamasaki 2000). Or, à l'inverse de la cytochrome *c* oxydase, l'AOX n'est pas sensible à cet inhibiteur (Millar et Day 1996).

Une dernière fonction — un peu paradoxale — de la voie alternative serait de servir de réserve de production d'ATP dans des situations où la demande énergétique dépasse la capacité de phosphorylation de la voie des cytochromes (Wagner et Krab 1995).

Chez les champignons, la synthèse d'AOX est généralement conditionnée par la restriction de la voie des cytochromes ou par l'exposition aux ROS. Pourtant, l'expression hétérologue des gènes *Aox1a* et *Aox1b* de *C. albicans* n'améliore pas la croissance d'une souche transgénique de *S. cerevisiae* cultivée en présence de cyanure. De même, des cellules de *C. albicans* surexprimant artificiellement l'AOX présentent une résistance au stress oxydant similaire à celle des souches de contrôle (Huh et Kang 1999, 2001). Il n'est donc pas certain que l'AOX ait exactement la même raison d'être chez ces organismes non photosynthétiques que chez les plantes supérieures. Par contre, la voie alternative joue sans doute un rôle important chez les champignons pathogènes, puisque ceux-ci sont amenés à se défendre contre le NO produit au cours de la réponse hypersensible de leurs hôtes végétaux (revue par Beligni et Lamattina 2001 ; Joseph-Horne et al. 2001).

Sur la question d'une hypothétique fonction énergétique, il a été montré que le transfert d'électrons au travers du complexe I et de la seule AOX génère suffisamment d'ATP pour assurer la viabilité de cellules fongiques. L'inhibition de la voie alternative provoque en outre une importante chute du potentiel membranaire dans des mitochondries isolées de *Gaeumannomyces graminis* et de *Fusarium oxysporum*, ainsi que dans des mycélias de *Botrytis cinerea*, *G. graminis* et *Sclerotinia homeocarpa*. Chez *G. graminis*, la même inhibition de l'AOX conduit par ailleurs à une chute de la production d'ATP, et ce quel que soit l'état d'inhibition du complexe III. Ajoutés à l'activation de l'enzyme par les nucléotides de purine, dont l'ADP, l'AMP et le GMP (mais pas l'ATP), ces arguments plaident en faveur d'un vrai rôle énergétique complémentaire pour l'AOX fongique (revue par Joseph-Horne et al. 2001).

Chapitre 3

Respiration mitochondriale chez *Chlamydomonas reinhardtii*

3.1 Description de l'organisme

Le genre *Chlamydomonas* regroupe des algues vertes unicellulaires appartenant à l'ordre des Chlamydomonales (classe des Chlorophycées). Ce sont des eucaryotes cosmopolites qui vivent tant dans les sols, qu'en eau douce ou salée, voire dans la neige des sommets montagneux. Entourées d'une paroi glycoprotéique complexe, les cellules possèdent par ailleurs un noyau structuré, un chloroplaste unique, plusieurs mitochondries, un stigma sensible à la lumière et une paire de flagelles apicaux assurant la mobilité des cellules. Plus de cinq cents espèces de *Chlamydomonas* ont été décrites, mais seules quelques-unes sont étudiées en laboratoire.

L'espèce la plus utilisée est *Chlamydomonas reinhardtii*. Il s'agit d'un organisme haploïde d'une dizaine de microns capable de croître en milieu strictement minéral. Elle peut cependant se développer à l'obscurité si de l'acétate est disponible comme source de carbone organique. Lorsqu'elles sont carencées en azote, les cellules se différencient en gamètes de type sexuel mt^+ ou mt^- . Des gamètes de sexes opposés fusionnent pour former un zygote diploïde. Celui-ci s'entoure d'une solide paroi externe et se différencie progressivement en zygospore. Au retour de conditions favorables (azote, lumière et eau), la zygospore subit la méiose et libère quatre cellules haploïdes (deux de chaque sexe) prêtes à reprendre le cycle végétatif (Figure 3.1). Au lieu de se différencier en zygospore, certaines cellules diploïdes (2 à 10 % de la population) sont capables de se diviser par mitose pour donner naissance à des colonies diploïdes. De plus, des cellules diploïdes peuvent également subir une cytokinèse avant que les deux noyaux parentaux n'aient fu-

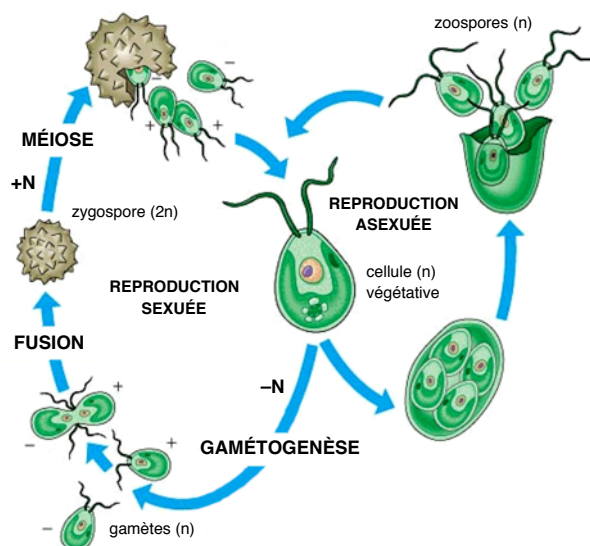


FIG. 3.1. Cycle vital de *C. reinhardtii*.

sionné. Lorsque cela se produit, on obtient des cytoductants porteurs d'un noyau haploïde au sein d'un cytoplasme hybride (voir Matériel et Méthodes, chapitre 9, section 9.2.4).

En quelques décennies, *Chlamydomonas* est devenu un modèle génétique pour l'étude de la photosynthèse, de la biogenèse des organites, de la structure des flagelles, de la mobilité cellulaire et du phototactisme, des rythmes circadiens, ainsi que de bien d'autres aspects de biologie cellulaire et moléculaire (revue par Harris 1989, 1998 ; Rochaix 1995).

3.1.1 Génomes nucléaires et chloroplastiques

Comme les autres eucaryotes photosynthétiques, *C. reinhardtii* possède trois systèmes génétiques différents, situés respectivement dans le noyau, le chloroplaste et les mitochondries. Les mutations affectant chacun de ces génomes sont discernables sur base de leur mode de transmission lors de croisements : alors que les allèles nucléaires ségrègent selon un mode mendélien, les génomes du plaste (80 copies) et du chondriome (50 copies) sont transmis à la descendance selon un mode uniparental, respectivement à partir du parent *mt*⁺ ou du parent *mt*⁻ (revue par Rochaix 1995).

Le génome nucléaire d'une cellule haploïde compte de l'ordre de cent millions de paires de bases (1×10^5 kb) réparties sur 17 chromosomes. Outre un contenu en GC particulièrement élevé (62%), il comprend une grande proportion de séquences répétées. Les gènes qu'il encode sont généralement interrompus par de nombreux introns de petite taille (~220 pb) et présentent souvent de longues 3'-UTRs (revue par Silflow 1998). Ces dernières années, plusieurs projets de grande envergure tournant autour des génomes de *C. reinhardtii* ont été lancés sous le nom générique de *Chlamydomonas Genome Project*^{1,2}. L'un des objectifs principaux est le séquençage du génome nucléaire. À l'heure actuelle, environ 15 000 clones BAC couvrant théoriquement 8× celui-ci ont été générés et leurs extrémités séquencées. La première séquence du génome nucléaire complet est attendue pour Janvier 2003. Les autres volets du projet sont également très avancés. Ils concernent notamment la génération de banques EST dans diverses conditions de culture, la construction de puces à ADN et l'alignement de l'ensemble des cartes physiques et génétiques disponibles en vue de permettre le clonage positionnel rapide de gènes d'intérêt.

Le génome chloroplastique de *C. reinhardtii* a été complètement séquencé en 2001. Molécule circulaire de 203 kb, il se compose de deux régions uniques d'environ 80 kb, séparées l'une de l'autre par deux longs segments répétés inversés de 21,2 kb. Le génome comporte 99 gènes, dont un jeu complet de tRNAs. Une de ses caractéristiques remarquables est le fait que plus de 20% de sa séquence soit composée d'éléments répétitifs de classes diverses, localisés dans les régions

intergéniques. Apparemment, la seule autre algue verte disposant d'un génome chloroplastique similaire est *Chlorella vulgaris* (Maul et al. 2002).

3.1.2 Transformation du génome nucléaire

Après des débuts laborieux, la transformation génétique de *C. reinhardtii* ne s'est véritablement développée qu'avec la découverte de marqueurs de sélection efficaces, couplée à la mise au point de méthodes performantes d'introduction d'ADN exogène. Depuis lors, les progrès techniques se sont succédé, adaptant à cet organisme toute une panoplie d'outils moléculaires modernes : gènes rapporteurs, technologies sens et antisens, banques de cosmides, de YACs (pour *Yeast Artificial Chromosome*) et de BACs (pour *Bacterial Artificial Chromosome*). Outil très performant, la transformation génétique a cependant ses limites. Tout d'abord, l'intégration de l'ADN dans le génome nucléaire s'effectue au hasard, ce qui rend difficiles les approches de génétique inverse. Ensuite, les événements d'intégration s'accompagnent très souvent de grandes délétions, ce qui complique considérablement l'analyse des mutants générés par mutagenèse insertionnelle.

Les marqueurs de sélection classiquement utilisés sont les gènes de l'argininosuccinate lyase (*Arg7*) et de la nitrate réductase (*Nia1*), qui complètent respectivement les souches mutantes *arg7* (incapables de croître en absence d'arginine exogène) et *nial1* (incapables de croître en présence de nitrate). Par ailleurs, les gènes de résistance à l'émétine (*Cry1*) de *C. reinhardtii* et de résistance à la phléomycine (*ble*) de *Streptoalloteichus hindustanus* ont été testés avec succès comme marqueurs dominants pour la transformation nucléaire. Quant au gène *aadA*, conférant la résistance à la spectinomycine et à la streptomycine, il constitue un excellent marqueur de transformation chloroplastique, tout en se montrant également applicable en transformation nucléaire.

En outre, un avantage déterminant de la transformation nucléaire de *C. reinhardtii* est la possibilité d'introduire dans les cellules un gène dépourvu de phénotype sélectionnable par co-transformation avec l'un de ces marqueurs.

Une méthode simple pour introduire de l'ADN exogène dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii* est la technique des billes de verre. Celle-ci ne re-

1. http://www.biology.duke.edu/chlamy_genome/cgp.html

2. <http://bahama.jgi-psf.org/prod/bin/chlamy/home.chlamy.cgi>

quiert aucun équipement particulier, mais ne permet d'atteindre que des taux de transformation relativement faibles (de l'ordre de 1×10^3 transformants par μg d'ADN). En revanche, des taux de transformation dépassant les 1×10^5 transformants par μg d'ADN ont été obtenus par électroporation. Par ailleurs, la biolistique est le procédé le plus efficace pour transformer le chloroplaste : celui-ci occupant plus de la moitié du volume cellulaire, il constitue une large cible pour les microprojectiles (*revue par* Kindle 1998 ; Grossman 2000).

3.2 Génétique de la mitochondrie

Les complexes de la membrane interne des mitochondries de *C. reinhardtii* semblent organisés de façon similaire à ceux des plantes supérieures. La voie alternative de la respiration y est présente (Alexander et al. 1974 ; Wiseman et al. 1977), de même qu'au moins l'une des NAD(P)H déshydrogénases insensibles à la roténone (Duby et Matagne 1999).

3.2.1 Génome mitochondrial

Le génome mitochondrial de *C. reinhardtii* est une petite molécule linéaire de 15,8 kb, dont la séquence a été complètement déterminée en 1993. À côté de huit polypeptides constitutifs des complexes I (ND1, ND2, ND4, ND5 et ND6), III (COB ou apocytochrome *b*) et IV (COX1), l'ADN mitochondrial encode deux rRNAs dont les séquences sont organisées sous forme de modules en mosaïque, trois tRNAs et une protéine (RTL) apparentée à une transcriptase inverse. Les télomères du génome mitochondrial sont composés de segments inversés répétés de 531 pb, dont les dernières 86 pb sont également présentes à 674 pb de l'extrémité droite du génome (Figure 3.2). Ces trois répétitions, ainsi que la protéine RTL, sont sans doute impliquées dans la réplication de la molécule (*revue par* Remacle et al. 2001b ; Matagne et Remacle 2002).

Comme nous l'avons signalé antérieurement, lors de croisements, la descendance méiotique hérite quasi-exclusivement du génome mitochondrial de la souche parentale *mt*⁻.

3.2.2 Mutants mitochondriaux

De nombreux mutants mitochondriaux ont été isolés dans notre laboratoire après mutagenèse à l'acri-flavine ou au bromure d'éthidium (Matagne et al.

1989 ; Dorthu et al. 1992 ; Colin et al. 1995 ; Duby et Matagne 1999 ; Remacle et al. 2001a). Ces mutants *dum* (pour *dark uniparental minus*) sont classés en deux groupes : les premiers sont incapables de croître à l'obscurité en présence d'acétate (phénotype *dark*⁻), tandis que les seconds présentent une croissance très ralentie par rapport à une souche de type sauvage (phénotype *dark*^{+/-}). Cultivés à la lumière sur milieu minéral, tous ces mutants se développent à une vitesse proche de la normale (*revue par* Remacle et al. 2001b ; Matagne et Remacle 2002).

Les mutants des complexes III et IV, dépourvus de la voie des cytochromes à la suite d'altérations des gènes *cob* ou *cox1*, sont des photo-autotrophes obligatoires (phénotype *dark*⁻). Leur respiration assurée par le complexe I et la voie alternative montre les caractéristiques attendues, à savoir la résistance à l'antimycine A, au myxothiazol et au cyanure, couplée à la sensibilité à la roténone, au SHAM et au PG. Beaucoup des mutants de ce groupe ont une délétion 5'-terminale touchant le gène *cob* et conduisant à la perte d'activité du complexe III. Les autres mutants caractérisés résultent d'une mutation ponctuelle (substitution ou *frameshift*) dans les gènes *cob* ou *cox1* (Figure 3.2 ; Matagne et al. 1989 ; Dorthu et al. 1992 ; Colin et al. 1995).

Récemment, quatre mutants du complexe I ont été identifiés sur base de leur faible croissance à l'obscurité (phénotype *dark*^{+/-}) et de leur résistance à la roténone. Sensibles à l'antimycine A, au myxothiazol et au cyanure, ils portent des mutations ponctuelles (*frameshift*) dans les gènes *nd1*, *nd6* ou dans la 3'-UTR du gène *nd5* (Figure 3.2 ; Remacle et al. 2001a ; Cardol et al. 2002).

Trois mutants ayant perdu à la fois l'activité du complexe I et de la voie des cytochromes ont également été isolés. Par rapport aux précédents, leur croissance à la lumière est nettement réduite. C'est aussi le cas de leur respiration qui ne repose que sur les seules activités (non phosphorylantes) des NAD(P)H déshydrogénases insensibles à la roténone, du complexe II et de l'AOX (Duby et Matagne 1999 ; Remacle et al. 2001a).

3.3 Oxydase alternative

Outre *C. reinhardtii*, diverses algues vertes telles que *Chlorella pyrenoidosa* et *Nitella clavata* possèdent une voie alternative. Par contre, *Selenastrum minutum*, *Polytoma uvella* et *Polytomella* sp. en sont dépourvues, ces deux dernières ayant en outre perdu leur

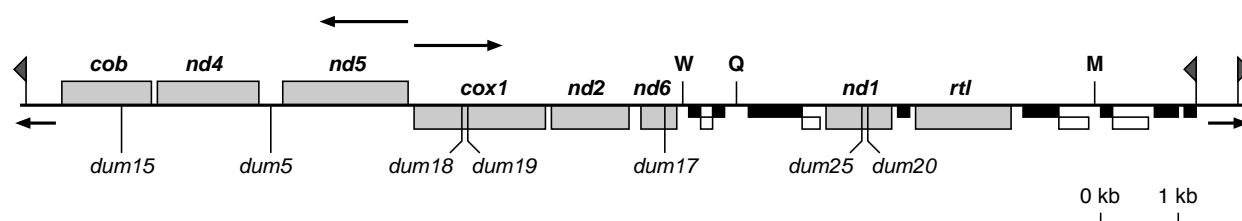


FIG. 3.2. Représentation schématique du génome mitochondrial de *C. reinhardtii* montrant les positions des gènes et des mutations ponctuelles isolées dans notre laboratoire. Les longues flèches indiquent le sens de la transcription, tandis que les courtes flèches représentent les segments inversés répétés de 531 pb. Les trois copies de la répétition de 86 pb sont localisées par les drapeaux. *cob* : apocytochrome *b* du complexe III; *cox1* : sous-unité I de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV); *nd1*, 2, 4, 5 et 6 : sous-unités de la NADH:ubiquinone oxydoréductase (complexe I); *rtl* : *reverse transcriptase-like protein*. Les rectangles noirs et blancs symbolisent les modules encodant respectivement les rRNAs des grande et petite sous-unités. W, Q et M : tRNAs du tryptophane, de la glutamine et de la méthionine. Les positions des mutations *dum5*, *dum15*, *dum17*, *dum18*, *dum19*, *dum20* et *dum25* sont montrées (adapté de Remacle et al. 2001b).

capacité de photosynthèse (revue par Vanlerberghe et McIntosh 1997; Reyes-Prieto et al. 2002).

3.3.1 Études biochimiques

La voie alternative de *C. reinhardtii* a surtout été étudiée en termes de capacité respiratoire. En conditions photo-autotrophes, l'addition de cyanure réduit modestement (20%) la consommation d'oxygène des cellules (Husic et Tolbert 1987; Goyal et Tolbert 1989), indiquant que la capacité de la voie alternative est constitutivement élevée chez cet organisme. Au cours de la croissance exponentielle de cellules cultivées sous atmosphère riche en CO₂, la capacité de la voie alternative diminue considérablement. Elle retrouve néanmoins son amplitude normale au moment où les cellules entrent en phase stationnaire. Lorsque le niveau de CO₂ est élevé et que la capacité de la voie alternative est faible, l'addition de cyanure ou d'acide salicylique induit sa réapparition (Goyal et Tolbert 1989). À faible teneur en CO₂, la présence d'acétate dans le milieu de culture conduit à une stimulation de la respiration d'un facteur deux à trois (Fett et Coleman 1994; Endo et Asada 1996). Cet accroissement est apparemment lié à la seule augmentation de la capacité de la voie des cytochromes, sans aucune modification de la capacité de la voie alternative (Matagne et al. données non publiées).

3.3.2 Caractérisation moléculaire

Comme pour la plupart des espèces examinées, l'AOX de *C. reinhardtii* a été détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'enzyme de *S. gut-*

tatum. La protéine se présente sous la forme d'une faible bande de 36 kDa (Derzaph et Weger 1996).

C'est dans notre laboratoire qu'ont été clonés les cDNAs *Aox* de cet organisme. En combinant PCR, RT-PCR et criblage d'une banque cDNA, deux gènes ont été identifiés, le gène *Aox1* étant beaucoup plus exprimé que son homologue *Aox2* (Dinant et al. 1998, 2001).

L'analyse de la séquence du cDNA *Aox1* (2,2 kb) a révélé la présence d'une ORF de 1080 pb encodant une protéine de 360 acides aminés (38,4 kDa). Un peptide signal typique de 50 résidus de long, riche en leucine, alanine et sérine, a été défini. Dans sa partie centrale, une dizaine d'acides aminés (LA-SASRLLGS) sont capables de former une hélice α amphiphile positivement chargée. Sans ce peptide signal, la taille de la protéine mature est de 310 résidus (33,4 kDa). Les autres caractéristiques du cDNA *Aox1* (contenu en GC élevé, usage des codons très biaisé, longue 3'-UTR et motif TGTAAG comme possible signal de polyadénylation) sont classiques pour un gène nucléaire de *C. reinhardtii*. Par ailleurs, son origine de transcription a été positionnée par *primer extension* à 62 pb en amont de l'ATG putatif (Dinant et al. 2001).

Long de 1,7 kb, le cDNA *Aox2* présente une ORF de 1041 pb encodant une protéine de 347 acides aminés (37,6 kDa). À l'instar du gène *Aox1*, ses 50 résidus N-terminaux, riches en alanine et leucine, contiennent un segment (LASTGRLLGS) susceptible de former une hélice α amphiphile positivement chargée. Celle-ci est précédée de deux groupes d'acides aminés (LPALVPFAA) directement répétés. Le site de clivage n'a cependant pu être déterminé (Dinant et al. 2001).

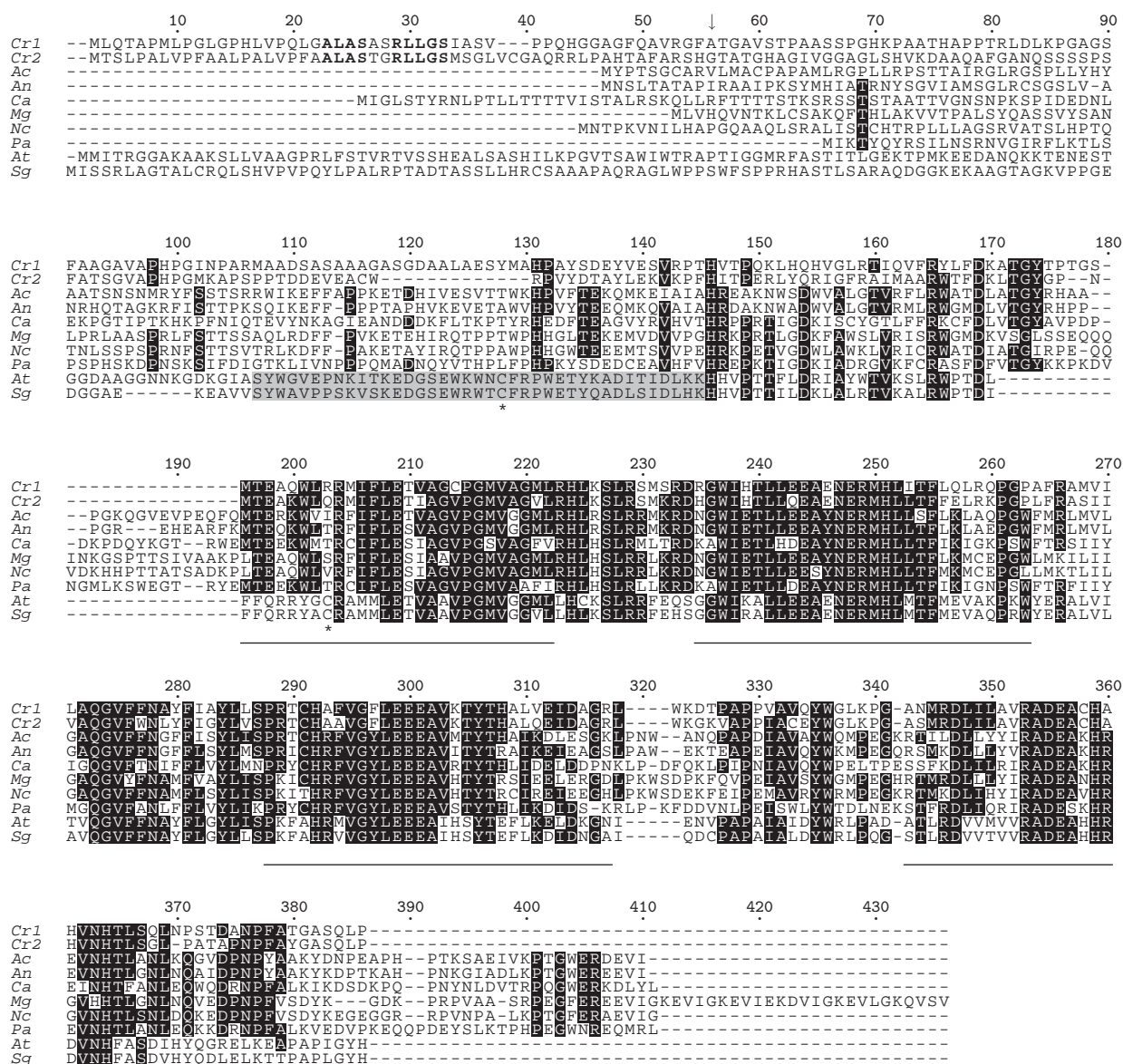


FIG. 3.3. Alignement multiple des séquences AOX1 et AOX2 de *C. reinhardtii* (Cr1 et Cr2) avec les AOXs de six champignons — *Ajellomyces capsulatus* (Ac, clone 1; GenBank AAD29680), *Aspergillus niger* (An; Kirimura et al. 1999), *Candida albicans* (Ca, gène *Aox1a*; Huh et Kang 1999), *Magnaporthe grisea* (Mg; Yukioka et al. 1998), *Neurospora crassa* (Nc; Li et al. 1996) et *Pichia anomala* (Pa; Sakajo et al. 1991) — et de deux plantes supérieures — *Arabidopsis thaliana* (At, gène *Aox1a*; Kumar et Soll 1992) et *Sauromatum guttatum* (Sg; Rhoads et McIntosh 1991). Les résidus identiques dans au moins 50% des séquences sont imprimés sur fond noir et le domaine de 40 acides aminés spécifique aux AOXs végétales sur fond gris (Umbach et Siedow 2000). Les deux cystéines conservées chez les plantes supérieures sont marquées d’une astérisque, tandis que les quatre hélices du modèle d’Andersson et Nordlund (1999) sont soulignées. Les neuf résidus conservés des peptides signaux putatifs des séquences AOX1 et AOX2 de *C. reinhardtii* sont en caractères gras, alors que le résidu N-terminal de la protéine AOX1 mature (A51; numérotation de la séquence algale) est indiqué d’une flèche (*adapté de* Dinant et al. 2001).

Bien que les séquences des cDNAs *Aox1* et *Aox2* soient très similaires dans leurs deux derniers tiers, elles ne totalisent que 56,7% d'identité peptidique. Dans le premier tiers, la seule zone d'homologie indiscutable est l'hélice α amphiphile du peptide signal. Les régions centrale et C-terminale des protéines AOX1 et AOX2 de *C. reinhardtii* s'alignent très bien avec les séquences AOX de plantes supérieures et de champignons (Figure 3.3). Cet alignement révèle que le domaine de 40 acides aminés entourant la cystéine régulatrice, caractéristique des plantes supérieures, est absent des AOXs de *C. reinhardtii* et de champignons. À l'inverse, l'insert fonctique de 20 à 25 résidus se retrouve partiellement dans les séquences algales, où il est réduit à moins de 10 acides aminés. Les extrémités C-terminales ne présentent pour leur part aucune trace de l'extension spécifique aux champignons. Les protéines AOX1 et AOX2 de *C. reinhardtii* apparaissent donc de structure intermédiaire entre les AOXs de plantes supérieures et celles de champignons, quoique légèrement plus proches de ces derniers en termes d'identité peptidique (31,1 à 38,1% par rapport aux AOXs fongiques contre 28,5 à 30,6% vis-à-vis des AOXs végétales). En ce qui concerne les résidus impliqués dans le modèle de site actif d'Andersson et Nordlund (1999) et dans le site putatif de liaison à l'ubiquinone, ils sont tous conservés dans les deux AOXs de *C. reinhardtii* (Dinant et al. 2001).

La séquence génomique de l'AOX2 a également été identifiée (Dinant et al. 2001). Elle comporte 12 exons séparés par 11 introns pour 4,4 kb de longueur (voir Résultats, chapitre 4, section 4.3 et Discussion, chapitre 7, section 7.1).

3.3.3 Tentatives d'inactivation des gènes *Aox*

Au cours de notre mémoire de licence (Baurain 1997), nous avons tenté de supprimer l'activité de l'AOX par technologie antisens (*revue par* Bourque 1995; Kuipers et al. 1997). Deux types de plasmides contenant le cDNA *Aox1* placé en orientation antisens sous le contrôle des régions régulatrices du gène *Rbcs2* (Goldschmidt-Clermont et Rahire 1986; Stevens et al. 1996) ont été introduits dans *C. reinhardtii* par co-transformation avec le marqueur de sélection *Arg7*. Nous avons ensuite recherché parmi un millier de transformants *arg*⁺ des clones susceptibles d'avoir perdu l'activité AOX en testant leur sensibilité à l'antimycine A. Le principe de la sélection était que des cellules simultanément pri-

vées de voie alternative (par effet de la construction antisens) et de voie des cytochromes (par effet de l'inhibiteur respiratoire) devaient être incapables de croître sur le milieu sélectif, contrairement à des cellules chez lesquelles l'AOX est fonctionnelle (Bertrand et al. 1983). À l'issue de ce crible, 18 clones sensibles ont été isolés, dont deux présentaient effectivement une réduction partielle de la voie alternative (résultats publiés dans Dinant et al. 1998).

Deux causes pouvaient être à la base de ce semi-échec : (i) une faible efficacité de la construction antisens dans l'extinction simultanée des deux gènes *Aox* (pour lesquels aucune donnée d'expression n'était disponible à l'époque) et (ii) un taux trop bas de transformants *arg*⁺ porteurs de la construction antisens et capables de l'exprimer. Au cours de notre première année de thèse, nous avons repris nos essais en tentant de répondre à ces problèmes par la conception d'un plasmide unique portant à la fois le marqueur de sélection et la cassette antisens. Cette cassette était réduite à la seule séquence codante du cDNA *Aox1* (région de forte identité entre les deux gènes *Aox*) et toujours placée sous le contrôle des régions régulatrices du gène *Rbcs2*. Les résultats de ces nouvelles expériences s'étant avérés négatifs, nous avons décidé d'abandonner cette ligne de recherche et de consacrer nos efforts au clonage, à la caractérisation et à l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Aox1*.

Depuis lors, la technologie antisens appliquée à *C. reinhardtii* a fait des progrès considérables (Schroda et al. 1999; Fuhrmann et al. 2001). C'est ainsi que des clones totalement dépourvus d'activité AOX ont été obtenus par M. Dinant à l'aide d'une construction combinant un segment de la séquence génomique *Aox1* — isolée et caractérisée dans le cadre de ce travail — au segment homologue du cDNA disposé en orientation antisens et sous le contrôle du promoteur *Aox1* endogène. Parfaitement viables en conditions de culture normales, ces transformants déficients en AOX sont aujourd'hui en cours d'investigation (Dinant et Matagne, données non publiées).

3.4 Buts du travail

Ce travail poursuit trois objectifs principaux, à savoir (1) le clonage et la caractérisation du gène *Aox1*; (2) l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Aox1* et (3) l'analyse de la structure du promoteur *Aox1*. Chacun fera l'objet d'un chapitre spécifique dont les traits majeurs sont repris ci-après.

1. Comme mentionné précédemment, les cDNAs *Aox1* et *Aox2* de *Chlamydomonas reinhardtii*, ainsi que la séquence génomique *Aox2*, ont été isolés et caractérisés dans notre laboratoire (Dinant et al. 1998, 2001). D'autre part, Quesada et al. (1998b) ont cartographié la position du gène *Aox1* à proximité d'un gène déjà connu, *Nrt2;3*. Les deux gènes se trouvent en orientation inverse l'un par rapport à l'autre et sont séparés par une région de 1,4 kb contenant leurs promoteurs respectifs. Ce chapitre présentera la stratégie mise en œuvre pour l'amplification d'un fragment de 5,3 kb correspondant à la séquence génomique *Aox1* (régions codante et promotrice), suivie du séquençage du produit obtenu et de la comparaison de sa structure avec celle du gène *Aox2*.
2. Disposant de la séquence génomique *Aox1*, nous entreprendrons d'en étudier la régulation transcriptionnelle à l'aide du système rapporteur *Ars* (arylsulfatase). Après introduction d'une construction chimérique *Aox1/Ars* dans *C. reinhardtii* et analyse moléculaire des transformants retenus, nous examinerons l'effet des inducteurs classiques de l'AOX, des mutations mitochondriales et de la source d'azote — cette dernière ayant été abordée au cours d'hybridations sur *Northern blots* par Quesada et al. (1998b, 2000). Parallèlement, nous chercherons à savoir si la régulation observée se répercute aux niveaux protéique et respiratoire. Nous tenterons par ailleurs d'étudier la régulation du gène *Aox2* selon le même principe, celui-ci étant beaucoup plus faiblement transcrit que son homologue *Aox1* (Dinant et al. 2001).
3. Ayant défini les conditions d'expression du gène *Aox1*, nous nous intéresserons à la structure de son promoteur par le biais d'une étude de délétions sériées. Celles-ci seront réalisées en deux temps, les premières destinées à identifier le promoteur *Aox1* minimal toujours soumis à régulation, les secondes servant à définir les segments capables de conférer la régulation observée à un promoteur minimal. Enfin, nous recourrons à une analyse bioinformatique pour tenter de localiser des motifs nucléotidiques susceptibles d'intervenir dans l'expression du gène *Aox1*.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 4

Clonage et caractérisation du gène *Aox1*

4.1 Amplification et clonage du gène *Aox1*

Le cDNA du gène *Aox1* de *C. reinhardtii* (AF047832) a été isolé par M. Dinant lors du criblage d'une banque à l'aide d'une sonde spécifique (Dinant et al. 1998, 2001 ; voir aussi Introduction, chapitre 3, section 3.3.2). Par ailleurs, au cours d'une recherche de gènes impliqués dans l'import du nitrate et du nitrite chez le même organisme, Quesada et al. (1998b) ont identifié deux gènes, *Nrt2;3* et *Nar5*, l'un et l'autre régulés par la source d'azote présente dans le milieu de culture. Réprimés par l'ammonium et stimulés par le nitrate, tous deux sont situés en position tête-bêche sur un segment génomique d'environ 15 kb. *Nrt2;3* a été défini comme un nouveau membre de la famille de gènes *Nrt2* encodant des transporteurs du nitrate et/ou du nitrite, tandis que *Nar5* n'a pas été immédiatement caractérisé (Quesada et al. 1998b).

Lorsque la séquence du cDNA *Aox1* est apparue dans les banques de données, E. Fernandez et ses collaborateurs ont constaté que la séquence de l'extrémité 5' de *Nar5* correspondait à celle de l'extrémité 5' du gène *Aox1* (Quesada et al. 2000) et nous en ont fait part au printemps 1999.

Tirant parti de cette information, nous avons entrepris d'amplifier par PCR la région génomique comprise entre l'extrémité 5' de la séquence codante *Nrt2;3* et la fin de la 3'-UTR du cDNA *Aox1* (Figure 4.1-A ; p. 27). À cette fin, les amorces NRT23-5'R-L et AOX1-3'R-L ont été utilisées en présence d'un mélange commercial de *Taq* DNA polymérase et d'une seconde polymérase affichant une activité exonucléasique 3' → 5'.

Après deux séries successives de PCRs (soit 70 cycles ; voir Matériel et Méthodes, chapitre 9, section 9.4.12) effectuées sur l'ADN total de la souche

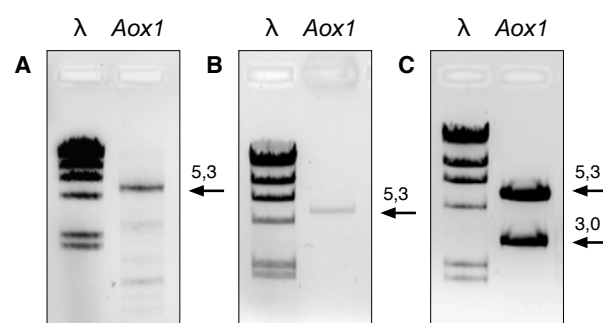


FIG. 4.2. Électrophorèses de contrôle des étapes de clonage du gène *Aox1*. A. Produits de PCR obtenus après double amplification de l'ADN total de la souche sauvage (25) à l'aide des amorces NRT23-5'R-L et AOX1-3'R-L. B. Purification sur gel de la bande à 5,3 kb correspondant au gène *Aox1*. C. Analyse par restriction *Eco*RI du plasmide porteur du fragment de 5,3 kb inséré dans le vecteur de clonage pGEM-T Easy (3,0 kb). λ: ADN du phage λ digéré par *Hind* III.

de type sauvage (souche 25 de notre collection), plusieurs produits d'amplification ont été obtenus, dont une bande majeure de 5,3 kb (Figure 4.2-A). Ce fragment a été purifié sur gel (Figure 4.2-B), puis adénylé et inséré au site *Eco*RV (modifié pour le *T/A* cloning) du vecteur pGEM-T Easy. Le mélange de ligation a ensuite été introduit par transformation dans la souche DH5α d'*Escherichia coli*. Parmi sept colonies blanches analysées, deux avaient intégré le plasmide recombinant. La Figure 4.2-C montre le profil électrophorétique obtenu après digestion de ce plasmide par *Eco*RI.

4.2 Séquençage du gène *Aox1*

Conformément à la stratégie de la Figure 4.1-B, le fragment cloné a été séquençé sur les deux brins à

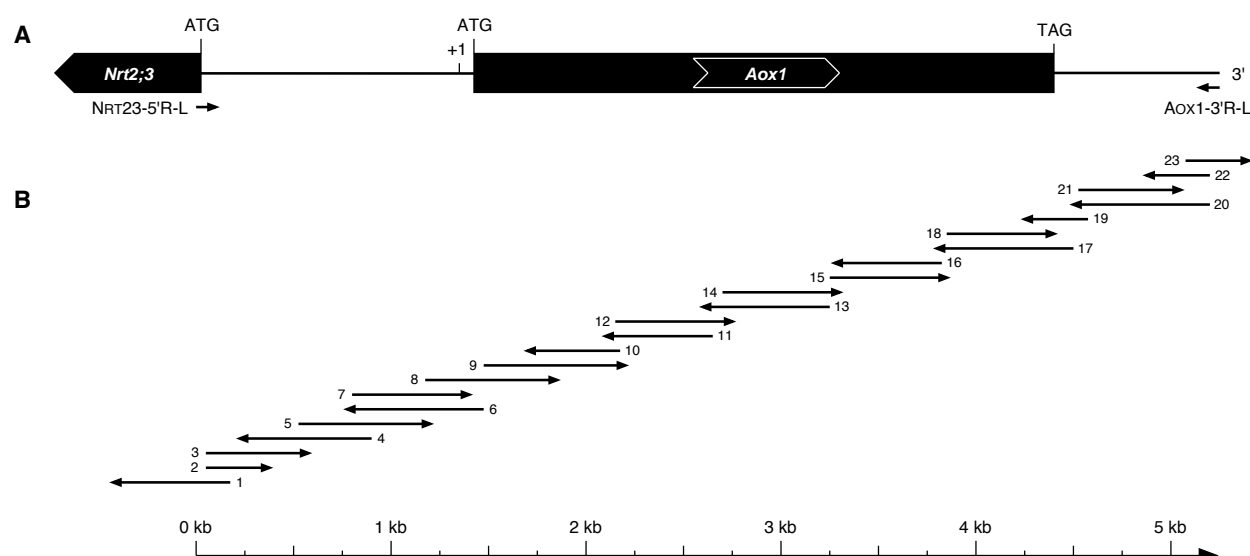


FIG. 4.1. **Stratégie d'amplification et de séquençage du gène *Aox1*.** **A.** Représentation schématique des gènes *Nrt2;3* et *Aox1* (E. Fernandez, communication personnelle). L'amorce NRT23-5'R-L chevauche les huit premiers codons et l'extrémité de la 5'-UTR du gène *Nrt2;3* (GenBank AJ223296; Quesada et al. 1998b), tandis que l'amorce AOX1-3'R-L est située à la fin de la 3'-UTR (GenBank AF047832; Dinant et al. 2001). +1 : origine de transcription. **B.** Position et orientation des 23 réactions de séquençage. Les amorces utilisées sont reprises au Tableau 8.2 du Matériel et Méthodes.

l'aide de 23 oligonucléotides. Les segments d'une longueur moyenne d'environ 600 pb ont été assemblés en un *contig* unique de 5253 pb, correspondant au gène *Aox1*.

Les 3918 derniers nucléotides de la séquence génique (GenBank AF314254) ont ensuite été alignés avec les 2010 pb du cDNA *Aox1* (Figure 4.3; pp. 29-30), ce qui nous a permis de déterminer le nombre et la position des introns, ainsi que de contrôler la fidélité de l'amplification du gène cloné.

L'alignement présenté à la Figure 4.3 montre que le gène *Aox1* est composé de huit exons séparés par sept introns. L'analyse des frontières exon/intron et intron/exon révèle que les motifs obtenus sont tout à fait canoniques (Tableau 4.1, gène *Aox1*).

En dépit du recours à une DNA polymérase capable de corriger les erreurs inhérentes à la réplication (activité *proofreading*), pas moins de neuf substitutions ont été relevées dans les régions communes au gène et au cDNA *Aox1*. Quatre modifications nucléotidiques affectent la séquence codante, tandis que les cinq autres concernent la 3'-UTR du gène amplifié. Si les deux premières altérations de la région codante ne touchent que le troisième nucléotide de chaque triplet, sans modification de l'acide aminé encodé, il n'en est pas de même pour les deux autres (Tableau 4.2). En effet, l'une de celles-

ci ($G_{732} \rightarrow A$) a pour conséquence de transformer une alanine (très conservée) en thréonine, tandis que l'autre ($T_{1033} \rightarrow C$) conduit au remplacement d'une leucine (modérément conservée) par une proline. Puisqu'elles ne modifient pas l'acide aminé encodé, il est possible que les deux premières substitutions correspondent à des variations clonales plutôt qu'à des erreurs introduites lors de la PCR.

4.3 Comparaison des gènes *Aox1* et *Aox2*

À titre de comparaison, nous avons aligné le gène *Aox2* avec son cDNA (Figure 4.4; pp. 30-32), tous deux clonés et séquencés par M. Dinant. Comme nous l'avons évoqué dans l'Introduction (voir chapitre 3, section 3.3.2), ce gène de 4255 pb a été isolé par criblage d'une banque génomique avec une sonde de 0,9 kb correspondant au produit d'amplification d'une région très conservée de l'AOX, tandis que le cDNA *Aox2* (1705 pb) a été obtenu par RT-PCR à l'aide d'amorces synthétisées à partir de la séquence génomique (d'où sa 3'-UTR amputée).

Composé de douze exons séparés par onze introns, le gène *Aox2* présente lui aussi des frontières exon/intron et intron/exon parfaitement canoniques (Tableau 4.1, gène *Aox2*).

TAB. 4.1. **Analyse des frontières exon/intron et intron/exon des gènes *Aox1* et *Aox2*.** cons : consensus de référence calculé pour les 266 introns de 44 gènes nucléaires de *C. reinhardtii* (Silflow 1998). Ce consensus a été établi par sélection du nucléotide présent dans plus de 60 % des séquences ou des deux nucléotides présents dans plus de 75 % des séquences. Les positions invariantes sont en caractères gras. ex : exon ; int : intron. Codes IUB-IUPAC : M = A/C ; R = A/G.

	exon			5' intron 3'					ex					
gène/int	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	-4	-3	-2	-1	+1	
Aox1	1	A	C	G	G	T	G	A	G	A	C	A	G	G
	2	A	A	G	G	T	G	G	G	G	C	A	G	C
	3	C	A	G	G	T	G	C	G	C	C	A	G	G
	4	G	G	G	G	T	G	A	G	C	C	A	G	G
	5	C	A	G	G	T	G	G	G	A	C	A	G	G
	6	G	C	C	G	T	G	A	G	T	C	A	G	T
	7	G	C	G	G	T	G	G	G	G	C	A	G	A
Aox2	1	A	C	G	G	T	A	A	G	G	C	A	G	G
	2	G	A	G	G	T	A	G	G	C	C	A	G	G
	3	C	G	G	G	T	A	A	G	G	C	A	G	C
	4	C	A	G	G	T	G	A	G	C	A	A	G	G
	5	C	C	A	G	T	G	A	G	G	C	A	G	T
	6	A	C	G	G	T	A	T	G	G	C	A	G	G
	7	C	C	T	G	T	G	A	G	A	C	A	G	G
	8	C	G	G	G	T	A	A	G	G	C	A	G	C
	9	C	A	G	G	T	A	G	G	G	C	A	G	G
	10	G	C	G	G	T	G	A	G	C	C	A	G	A
	11	C	A	C	G	T	G	A	G	G	C	A	G	G
cons	M	M	G	G	T	G	M	G	G	R	C	A	G	R

TAB. 4.2. **Substitutions nucléotidiques affectant la séquence codante du gène *Aox1* cloné, la séquence de référence étant celle du cDNA *Aox1* (GenBank AF047832).** La numérotation des nucléotides concerne le cDNA (Figure 4.3), tandis que celle des acides aminés correspondants (AA) débute à la première méthionine de la protéine. La fréquence¹ des codons (entre crochets) est exprimée en ‰. ex : exon.

ex	mutation	AA	effet sur la traduction
1	T ₁₄₃ → C	27	CGT _[5,4] Arg → CGC _[36,7] Arg
2	G ₄₂₈ → A	122	TCG _[16,7] Ser → TCA _[2,7] Ser
5	G ₇₃₂ → A	224	GCC _[55,5] Ala → ACC _[30,4] Thr
8	T ₁₀₃₃ → C	324	CTG _[65,5] Leu → CCG _[18,6] Pro

1. <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

L'alignement des régions codantes des gènes *Aox1* et *Aox2* ne laisse planer aucune doute quant à leur origine commune. La position de la plupart des introns est en outre très bien conservée entre les deux gènes. Toutefois, la structure du gène *Aox2* est sensiblement plus complexe que celle du gène *Aox1* (Figures 4.5 et 4.6 ; pp. 32-33 et 33).

4.4 Origine du cDNA chimérique *Aox1*

En comparant la séquence partielle du gène *Nar5* à celle du cDNA *Aox1*, E. Fernandez et ses collaborateurs ont remarqué que ce dernier présentait une extension 5' de 188 pb totalement absente de leur fragment génomique. Cette observation a été confirmée de notre côté, lors de la caractérisation du gène *Aox1*. Il était dès lors intéressant de déterminer l'origine probable de ce segment étranger (voir Annexe A, Figure A.1).

Dans un premier temps, nous avons cherché à aligner ce fragment avec des séquences génomiques de *C. reinhardtii* (BLASTn), mais nous n'avons obtenu aucun résultat. En revanche, une demi-douzaine d'ESTs (pour *Expressed Sequence Tags*) très similaires entre eux s'alignaient très bien avec notre segment. Ce résultat laisse donc penser qu'un fragment de messenger s'était accidentellement associé au transcrit du gène *Aox1* lors de la construction de la banque cDNA.

Afin d'en apprendre davantage sur ce messenger inconnu, nous avons tenté d'aligner l'EST homologue le plus long (583 pb ; GenBank BE442271) avec les séquences génomiques de *C. reinhardtii*. À notre grande surprise, environ 25 séquences apparentées à cet EST ont été identifiées par ce procédé indirect. Toutes appartenaient à la famille des gènes *LhcII* (pour *Light-Harvesting Chlorophyll-a/b Proteins*) encodant les protéines de liaison à la chlorophylle du photosystème II.

Parmi ces séquences, la plus similaire à cet EST est celle du cDNA *LhcII-1.3* (GenBank AB051208). Récemment caractérisé au cours d'une étude de cette famille multigénique, ce gène alimentait à lui seul plus d'1 % des 15 000 ESTs examinés (Teramoto et al. 2001). Il n'est donc pas étonnant que des fragments d'un messenger aussi abondant soient impliqués dans la genèse de cDNAs chimériques.

Les résultats des BLASTn, de même qu'une figure proposant un modèle des événements à l'origine de ce cDNA chimérique, sont présentés à l'Annexe A.

1	TATATTACTGTTTCCTTTACTATAACGGCGTAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGTTACGTCACCGT	gène
1	TAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGTTACGTCACCGT	cdNA
81	TCGATATCGCGATGCTTCAGACCGCACCTATGCTTCCGGGCTTGGGCCACACCTCGTCCCGCAATTGGGAGCCCTGGCC	gène
52	TCGATATCGCGATGCTTCAGACCGCACCTATGCTTCCGGGCTTGGGCCACACCTCGTCCCGCAATTGGGAGCCCTGGCC	cdNA
161	AGCGCTTCTCGCTTCTTGGGCTCCATAGCTTCGGTTCCGCCCCAGCACGGTGGTGTGGCTTCCAGGCTGTCCGGGGATT	gène
132	AGCGCTTCTCGCTTCTTGGGCTCCATAGCTTCGGTTCCGCCCCAGCACGGTGGTGTGGCTTCCAGGCTGTCCGGGGATT	cdNA
241	CGCCACGGTGAGCCTTCGCGTGGTTCTTTCACTTCTACACCGCCCTGGTTCTAACGTGTTGCGTTCTTTCGGAATAGCGG	gène
212	CGCCACG	cdNA
321	GTCGGGTGCGGGTACGTGAGCGAGGTGATTGCACCGATAGGCGCATGACGTTGCACGACTGCCCGACACTCGCACACCG	gène
219		cdNA
401	GTCCATGACCGCTTTCGACTCCTCAACAACCTCAACATCTCCACCCCCATGTTTCGCATGGGCGGGCGGCGGACCGGCGG	gène
219		cdNA
481	GGATGGTGGCAGAGGGGGCAGTGGTAACAGTGGTAGCAGTGGTAGCAGTGGTGGGAGCAAGGGCCCTAGTTAC	gène
219		cdNA
561	TACTTGCGGTGGCCGCGCGTGCCTGACGCTTGAAGTCTTCGCAATTGACCTGGCGACGGCCACGCCACATTGACCACGT	gène
219		cdNA
641	CACAGGCGCGCGTGGCAGCTGCTGCCAGCTCCCCCGGCCACAAAGCCGCTGCCACGCATGCGCGGCCACCCGCGCTG	gène
219	GGCGCGGTGAGCACGCCTGCTGCCAGCTCCCCCGGCCACAAAGCCGCTGCCACGCATGCGCGGCCACCCGCGCTG	cdNA
721	GACCTCAAGCCCGCGCGCGCTCCTTCGCGCGCGCGCGCTGGCGCCCCACCCCGGCATCAACCCAGCCCGCATGGCCGC	gène
294	GACCTCAAGCCCGCGCGCGCTCCTTCGCGCGCGCGCGCTGGCGCCCCACCCCGGCATCAACCCAGCCCGCATGGCCGC	cdNA
801	CGACAGCGCTCCGCGGCGCGCGTGCCTCTGGCGACGCGGCTCTGGCGGAGTCTATATATGGCGCACCCGCGCTACAGCG	gène
374	CGACAGCGCTCCGCGGCGCGCGTGCCTCTGGCGACGCGGCTCTGGCGGAGTCTATATATGGCGCACCCGCGCTACAGCG	cdNA
881	ACGAGTACGTGGAGAGCGTGGCGGCCACACACGTACCCCGCAGAGGGTGGTGCATGCCACGGTGTGGTGTAGAGTGTG	gène
454	ACGAGTACGTGGAGAGCGTGGCGGCCACACACGTACCCCGCAGAGG	cdNA
961	GTGTATGGCGCGCTGTAGGCGGGCAGGAGGGTTGGGGTCTATATGCCTCGTTCGTGCCTCTCTTCAGGTTAGTCCCGG	gène
501		cdNA
1041	TGAGCAACAACGCCCAACTTCCGGCTCCTCGCCCCGACGCTGACCAGCACGTGGGCTGCGCACCATCCAGGTCTTC	gène
501	CTGACCAGCACGTGGGCTGCGCACCATCCAGGTCTTC	cdNA
1121	CGCTACCTGTTTCGACAAGGCCACAGGTGCGCGGGAGGCAGACGCGTCCAGCCTTAGACCCATCTGGGGTGTGGACCC	gène
540	CGCTACCTGTTTCGACAAGGCCACAG	cdNA
1201	TGCCTTCAAGCGCATAAGGGAAGGGGTTACCCGCACAAGGCGCAGCTTGAACGTTCCGCACGTGGATCGCATGATTACC	gène
565		cdNA
1281	CGCCCTACCCAACCCCGCATACCGCGCCGACCCGCTGCTTCTGAACCTATTCCCCACCTCCTAGGCTACAAGCTCGCT	gène
565		cdNA
1361	TCTCCTTAATTACGGTAATCGTGAATGCGATCCCCACCTCCAGGCTACACGCCCACCGGCTCCATGACCGAGGCCCAGT	gène
565	GCTACACGCCACCGGCTCCATGACCGAGGCCCAGT	cdNA
1441	GGCTGCGGCGCATGATCTTCTGGAGACGGTGGCGGGCTGCCCGGGCATGGTGGCGGGCATGCTGCGCCACCTCAAGAGC	gène
601	GGCTGCGGCGCATGATCTTCTGGAGACGGTGGCGGGCTGCCCGGGCATGGTGGCGGGCATGCTGCGCCACCTCAAGAGC	cdNA
1521	CTCAGGTCCATGAGCCGCGACGGGGTGAGCTCGGCTGCGCGTGGCGAGGGGCAGGGAATGGAGGGGGAAAGAGGG	gène
681	CTCAGGTCCATGAGCCGCGACGGG	cdNA
1601	GGTACTGCGCTAGGTCTGTGCCTTGGATGTGAGAGGCCCTAACCGTAGCACGTTCACTTGGGGACGCGGAGACAAGTC	gène
706		cdNA
1681	TTTTCTCGGGGAGGGTGCGCAGGCGGTGCTGGCACCAGCACCCCATCCGCGCCCCATCCGCTGTGTGGCCACGAA	gène
706		cdNA
1761	CTCCCGTCAACGCGGACCCATCCTCAGCCTCTCAGACCGCTGTGACCTTTCCCTGCAACCCCTTCCATGCACCCACAG	gène
706		cdNA
1841	GCTGGATCCACACGCTGCTGGAGGAGACCGAGAACGAGCGCATGCACCTCATCACCTTCTGACGCTGCGGCAGCCCGGA	gène
706	GCTGGATCCACACGCTGCTGGAGGAGCCGAGAACGAGCGCATGCACCTCATCACCTTCTGACGCTGCGGCAGCCCGGA	cdNA
1921	CCCGCCTTCAGGGCCATGGTCATTCTGGCGCAGGTGGGATATGTGTTGATGTAGATTGGGGGCATGGCGGGGGTATGC	gène
786	CCCGCCTTCAGGGCCATGGTCATTCTGGCGCAG	cdNA
2001	AGTGCTTGGTGGGAGCGGTTGGGCTGGTGGGCTGGGTGTGTTACGGTGTGGGCGTCATTTGCTGCTTCCCATCTCCC	gène
819		cdNA
2081	GGCCAGGGCCGCGGCTACCACTCTGTTGTGCTTGTGACCCCCACCCCTCGCACATACCATCACACAGGGACATGCAC	gène
819		cdNA
2161	ATTCTGCTTAATCCTTGACATGCGCACTCATCACAGTTTCTGTTTTCCCTCACCACACAAGCACCCACCCCTCCCC	gène
819		cdNA
2241	TTCCACAGGGGGTGTCTTCAACGCCTACTTCATCGCCTACCTGCTGTGCGCGCACCTGCCACGCCGCTGAGTCAACAC	gène
819	GGGGTGTCTTCAACGCCTACTTCATCGCCTACCTGCTGTGCGCGCACCTGCCACGCC	cdNA
2321	TTACAAGCCTCAGTTTGGCGACTCTGTGCTGCACGTGTCCCGCCGACTCCTGCCCGAGGCTGCCAGAGCCCTGATTGG	gène
879		cdNA
2401	CACTCTCGGCCACTCCCTCATCTGCCCCACTTCTCCTGTCCGACATGCCCTGCCCTCCTGCTCCCTATGTGTGCCCCA	gène
879		cdNA
2481	CCTCTCTCAGTTTCGTGGGTTTCTGGAGGAGGAGGCTGTCAAGACATACACACAGCTCTCGTGGAGATTGACGCGGGCC	gène
879	TTCTGTGGTTTCTGGAGGAGGAGGCTGTCAAGACATACACACAGCTCTCGTGGAGATTGACGCGGGCC	cdNA

FIG. 4.3. **Alignement du gène *Aox1* cloné avec son cDNA.** Les codons initiateur (ATG) et terminateur (TAG) sont en caractères gras, de même que la TATA *box* (TATATAA) et le signal présumé de polyadénylation (TGTA). Les frontières exon/intron et intron/exon sont imprimées sur fond noir, tandis que les neuf substitutions probablement introduites au cours de l'amplification de la séquence génomique sont montrées sur fond gris. La numérotation des nucléotides est reprise des séquences AF047832 (cDNA) et AF314254 (gène) de GenBank.

1	TATAATAG CGCTCGAGTCGAAACTTCCATTGCGCTGCTCCTGCTGTGCGTTGCTCGTAGCTGTTGTCCCGCCGCATCAACA	gène
1	-----TGCTCCTGCTGTGCGTTGCTCGTAGCTGTTGTCCCGCCGCATCAACA	cdNA
81	CGATGAC ATCACTACCTCCAGCTTTGGTCCCTTTTCGCTGCACTCCAGCTTTGGTCCCTTTTCGCGGCACTCGCGAGTACAGGA	gène
48	CGATGAC ATCACTACCTCCAGCTTTGGTCCCTTTTCGCTGCACTCCAGCTTTGGTCCCTTTTCGCGGCACTCGCGAGTACAGGA	cdNA
161	CGGCTGCTGGGCAGCATGTCAGGGCTTGTGTGCGGGGCTCAGCGTCGCCTGCCGCTCACACAGCCTTCGCGCGCAGCCA	gène
128	CGGCTGCTGGGCAGCATGTCAGGGCTTGTGTGCGGGGCTCAGCGTCGCCTGCCGCTCACACAGCCTTCGCGCGCAGCCA	cdNA
241	TGGC ACGGTAAG CGGAGGGCTCCGCCAACCCCAACCCCTGCCTCAACCCCGGTTTACGATGTGTAAGGCAAGTCTTGAAC	gène
208	TGGCAGC-----	cdNA
321	TTGTTGACGGTTCGCGCCATTTACCT GCAGG CAACAGGTCATGCCGGAATTGTCGGTGGTGCGGGCCTGAGTCATGTCAA	gène
215	-----GCAACAGGTCATGCCGGAATTGTGCGTGGTGCGGGCCTGAGTCATGTCAA	cdNA
401	GGATGCCGCCCAGGCCTTCGCGGCCAACCAAGTCGTCATCAAGCCCTCCTTCGCCACCTCGGGCGTGGCCCCGCACCCAG	gène
265	GGATGCCGCCCAGGCCTTCGCGGCCAACCAAGTCGTCATCAAGCCCTCCTTCGCCACCTCGGGCGTGGCCCCGCACCCAG	cdNA
481	GCATGAAGGCCCCAGCCACCCACCGATGACGAAGTC GAGGTAGG CGCAGCAATCATCAAGCTTGGGAGCCGCCAGTGC	gène
345	GCATGAAGGCCCCAGCCACCCACCGATGACGAAGTCGAG-----	cdNA
561	CACCTCGCATGCATACAGCAGGAAGAGCTGGCAGGCCTATTGTGCGTGCCACCGCTTTTGCTTGTCCCTGCTGGCA	gène
386	-----	cdNA
641	AGCAGCAGGGACAAGCCCGTTAGCCTCATCCATAGCCTCCCCCCCCCTGCGGCCCTGCC CCAGG CCTGCTGGCGTCCGGT	gène
386	-----GCTTGTGCGTCCGGT	cdNA
721	GTACGACACTGCGTATCTGGAGAAAGTCAAGCCCTTCCACATCACCCCCGAG CGGGTAAG TACGCGTGTACATGCGCA	gène
403	GTACGACACTGCGTATCTGGAGAAAGTCAAGCCCTTCCACATCACCCCCGAGCGG-----	cdNA

801 458	TTGCCCCGGTCGCCTGACCTCCCAGCAATCACCTGCTGCATCTATCCACCCTTCGCCCTCGCTCGTGGCACGGCCACCGC	gène cDNA
881 458	GCCCTTGTAACGCACGCTGTGCACTGCGCATGTCCGTTGGCCTGTACTTTTCATGGTGTCTGCCTCGCAATCTCTGTTT	gène cDNA
961 458	TGTTGCT GCAGC TGTACCAGCGCATTGGCTTCCGAGCCATCATGGCCGCCCGGTGGACCTTCGACAAGCTGA CAGGTGAC CTGTACCAGCGCATTGGCTTCCGAGCCATCATGGCCGCCCGGTGGACCTTCGACAAGCTGACAG	gène cDNA
1041 522	CTGCTATAGCCGCAGAGAACTGGCGGGTGAGTTTGCTCTGAGCCCGCAACCATCCGTTCTCTGAGCCCGCAACATCCG	gène cDNA
1121 522	GCATTGGAGACTGCACATCCAGGCACATCTGCGCTCCATTTGTCTACACTGGCGGTCTGCGCAATTGATGCAGGTCTTTGCC	gène cDNA
1201 522	CCGGCTCCGGTACAGCAGCACTGCCCTTTTCGCTTGCTGGGTTGGCCCGCCCTTCGCCCTTGTCTAACAGCACTAACC	gène cDNA
1281 522	CCCTAACCTTCGGCCTGGCCCTGCTGCTGCC CAAGC CTACGGCCCCAACATGACCGAGGCTAAATGGCTGCAGCGCATG GCTACGGCCCCAACATGACCGAGGCTAAATGGCTGCAGCGCATG	gène cDNA
1361 566	ATCTTCCTGGAGA CCAGTGAG TACCGTAAACAGCTTTGAGCGCTTCAACGGAAAGGAGCAGCAGTTGCTACAGCGTGTGA ATCTTCCTGGAGACCA	gène cDNA
1441 582	GGGTTGCGCGCGGGTTACATGATGGCGTGTAAGCACGGATCTGTAGCTGCGGCACCCATAGGCAACGGCACGAAGCCAA	gène cDNA
1521 582	GTCCCGTTAACGGCTGGCTGGAATTGACGACTGACAGCGGCGCAACTTGTGTGGGGTTTCATTGCCATGC GCAGT TGCTGG TTGCTGG	gène cDNA
1601 589	CGTGCCGGGCATGGTGGCCGGAGTCCCTGCGTCACCTTAAGTCCCTGCGCTCGATGAAGCGCGACC ACGGTATG TGCTGCG CGTGCCGGGCATGGTGGCCGGAGTCCCTGCGTCACCTTAAGTCCCTGCGCTCGATGAAGCGCGACCAG	gène cDNA
1681 657	GCCTGCGGGACGTGTGAGGACTTGCTCCCAAACCCCAATGCCGCCGGGCGCATAGGGATAGGACTCTACGTTCTACCTCG	gène cDNA
1761 657	CTTCCTAGCCATTCCACCGCCGACACAGTCGCATTCGGTTCCGTTTTACGCATGCGCTCACGCACGCGCACTACTCGCA	gène cDNA
1841 657	CATCACCTTCTTCTCTTTACCTCCTCACTGCCACGCTCCCGCCCTCTCT GCAGG CTGGATCCACACCCTACTGCAAGA GCTGGATCCACACCCTACTGCAAGA	gène cDNA
1921 682	GGCTGAGAACGAGCGCATGCA CCTGTGAC TGAGCCGTCTCCGGCCAGCCACCTAGCCAGCGTACCGTGTGCAAACTCG GGCTGAGAACGAGCGCATGCACCT	gène cDNA
2001 706	ATCCTCGAATGCCGGCATCCACGCACCTTTATTTCCACGAAGCTATCCCATTTCCACGGAGCTATCCCGATGCTGGCCTC	gène cDNA
2081 706	ACGTCTACGCCCCAAGCAGTTGCCGTGCTGCGGCCGACCGCAGCTGCCGCTCATCATCACCCACTCAATCAGGGGATC	gène cDNA
2161 706	CCCTGCGCTCAAACACTACCTCTCGCGCCCGCTGACCAGCTGCTCCTCCCCCATCGCCGGT ACAGG CTGACGTTCTTCG GCTGACGTTCTTCG	gène cDNA
2241 720	AGCTGCGCAAGCCCGGTCCCTGTTCGCGCATCCATCATTTGTTGCGCAGGGCGTGTCTGGAACCTCTACTTCA TCGGG AGCTGCGCAAGCCCGGTCCCTGTTCGCGCATCCATCATTTGTTGCGCAGGGCGTGTCTGGAACCTCTACTTCA TCGGG	gène cDNA
2321 799	TAAG CCGCGACGGCGTGGATGGCCAGCACACCAACCCGCTGCAACGCCCTGCCGCGCCTGGAGCACCCGACGGCGTCTT	gène cDNA
2401 799	GCATTTGCATTACACTAGCTAACATTTCTGCCATCGTACTCACGCACACCCGTGTCCCTT GCAGC TACCTGGTATCGC CTACCTGGTATCGC	gène cDNA
2481 813	CGCGCACCTGCCACGCGCGGTGGGCTTCTTGAGGAGGAGGCTGTCAAGACCTACACACATGCGCTG CAGCTAGC TAGG CGCGCACCTGCCACGCGCGGTGGGCTTCTTGAGGAGGAGGCTGTCAAGACCTACACACATGCGCTGCAG	gène cDNA
2561 884	CTGTGCGGTATATAGAGGACGCACAATGCTGCCATTGTGGCCGCGCTTGATCGCTTGTCAGATTACAGCATCACAAAC	gène cDNA
2641 884	CTGCAACAAAGCAAATGGTGTGTACAAATAACACT GCAGC AGATTGACGCCGGGCGGCTTTGGAAGGGCAAGGTGGCGCC GAGATTGACGCCGGGCGGCTTTGGAAGGGCAAGGTGGCGCC	gène cDNA
2721 925	GCCCATCGCGTGCAGTACTGGGGCTCAAGCCCGCGCGTCCATGC CCGGTGAC CTACGCTCACCACGACTGGCTTGT GCCCATCGCGTGCAGTACTGGGGCTCAAGCCCGCGCGTCCATGC	gène cDNA
2801 975	GCGTGGGACTGGCTGGTCACGCTGGCTGGGTTAGGAGTGGTGCATGTTGGCATCTATTAGCGCATCTACAGTTTGGCAG	gène cDNA
2881 975	CGCCTGCGAGGGCGCGTGCTCACTACACACGCACAAGCCCGCGTGCGTACCACATACAGAGTTAATTATTACTCAAA	gène cDNA
2961 975	CCTGACATGTCTTCNCCCCCTCTACTTTACGTGGTTGCTACCCCCCTGCC CCAGA CCTCATCTGGCCGTCCGCGCCG ACCTCATCTGGCCGTCCGCGCCG	gène cDNA
3041 999	ATGAGGCTTGC CACGTGAG TCTATGACACATGTACGGTTAGGAATATGCCTTGCGTGCCGGGCGCATGTGCGTCAG ATGAGGCTTGCCAC	gène cDNA
3121 1013	GTTGCCGGGTGACTAGCGTACCAAGGCGTGCGCGCCGGGCGGGAATTCGTCACTACGGAGACTCCGTAGTCTCCTGCTA	gène cDNA
3201 1013	GTCATCAAGCCCTCCTACCAACCTAAACCCTGTCCCATCGCGCGCCCTCCTACCAGCCTGTACCAGCGTTCTCTGCGACG	gène cDNA

3281 1013	CATCCCACAGATGTCCGCTACCGCGATGCCAGCAGCCTAACACGTTCTCCCAGCTTGCGCCCGTCTTAACATGCTGTCCC	gène cDNA
3361 1013	CTGCTCCCCGTTTCGTGTCGCGTCCCC GCAGG CGCACGTGAACCACACGCTGTCCGGCTGCCCGCCACCGCCCCAACCC GCGCACAGTGAACCACACGCTGTCCGGCTGCCCGCCACCGCCCCAACCC	gène cDNA
3441 1063	CTTCGCGTACGGCGCCAGCCAGCTGCCG TAG CGAAGGAGGCCAGCTCAACCGCGCCTTTCTGTTGCTGTGGCAATAATGCG CTTCGCGTACGGCGCCAGCCAGCTGCCG TAG CGAAGGAGGCCAGCTCAACCGCGCCTTTCTGTTGCTGTGGCAATAATGCG	gène cDNA
3521 1143	GCCGCTCGGCCGATGATGCACGAACAGTGCCTGCGCGCATGCGTGCTCTCTGTGCCTTCTTTACTTTTATCAACTGTTAGCA GCCGCTCGGCCGATGATGCACGAACAGTGCCTGCGCGCATGCGTGCTCTCTGTGCCTTCTTTACTTTTATCAACTGTTAGCA	gène cDNA
3601 1223	ATGGACTGTCAACAATGTTGGAGTGAGATGATCACTTGAACGTGATAGGAGCTTAGCCGCAGCATGGCGTGAAGAGGCCATA ATGGACTGTCAACAATGTTGGAGTGAGATGATCACTTGAACGTGATAGGAGCTTAGCCGCAGCATGGCGTGAAGAGGCCATA	gène cDNA
3681 1303	AAGTGCCAATGTGCGTGCCTGCGGGGAGGCAAGCCAAATGCATTTCGTA	gène cDNA
3761 1383	CTGAGTTTCAGGACCCGGATGGCAGTACCAGATGTGGACGCGTTAGCTTGGACCAGGGGAGGGGCAGATAGAGAGGTAGC CTGAGTTTCAGGACCCGGATGGCAGTACCAGATGTGGACGCGTTAGCTTGGACCAGGGGAGGGGCAGATAGAGAGGTAGC	gène cDNA
3841 1463	GTGAGGCAGATCCGGCGCTCTTGCAACATGCATGGCGTAGATGTACCTGGGGTTGCGGGTTTATTTCTCGGTATGTTGTC GTGAGGCAGATCCGGCGCTCTTGCAACATGCATGGCGTAGATGTACCTGGGGTTGCGGGTTTATTTCTCGGTATGTTGTC	gène cDNA
3921 1543	TGTGTGTGCACGCAAACTACTTGCTGTTGTGTGTGCACTCATCCTTGTCAAAGGTCTCCGAACCACAGTAGGGGGGCTGTT TGTGTGTGCACGCAAACTACTTGCTGTTGTGTGTGCACTCATCCTTGTCAAAGGTCTCCGAACCACAGTAGGGGGGCTGTT	gène cDNA
4001 1623	GATGAGGACATGGGGCAAAGTAGGGCCAAAGTCAGAGCCACAGGCGGGCGTAGCAACCCGTAGAACAAGAAGAGATAG GATGAGGACATGGGGCAAAGTAGGGCCAAAGTCAGAGCCACAGGCGGGCGTAGCAACCCGTAGAACAAGAAGAGATAG	gène cDNA
4081 1703	GCAGCAGCAGACAAAGGAAACCGACAGGGCATGCAGGGTGT GTGTA TGGGACAGGGTTCAGGCAGGTTGGCGAGGTCCCAT GCA	gène cDNA
4161 1706	AGGGTGCAGCTGACGCCCTAGGGCATGCAGGGTATCAAAGGAAACGAGCAGCGAGCAGGTGGCATGCTGGCAAAGGCA	gène cDNA
4241 1706	TGGGATGATGGGTAC	gène cDNA

FIG. 4.4. **Alignement du gène *Aox2* avec son cDNA.** Les codons initiateur (ATG) et terminateur (TAG) sont en caractères gras, de même que la TATA *box* (TATAATA) et le signal présumé de polyadénylation (TGTGA). Les frontières exons/introns et introns/exons sont imprimées sur fond noir. La numérotation des nucléotides est reprise des séquences AF285187 (cDNA) et AF314255 (gène) de GenBank.

		exon 1																																		
63	A	M	L	Q	T	A	C	P	M	L	P	G	G	L	G	P	A	L	V	P	Q	L	G	A	L	A	S	A	S	R		Aox1				
50	ATC	CTT	CAG	ATC	CC	AC	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	Aox2				
		M	T	S	L	P	A	L	V	P	F	A	A	L	P	A	L	V	P	F	A	A	L	A	S	T	G	R								
		exon 1																																		
143	T	C	T	T	G	G	C	T	A	G	C	T	T	C	G	T	P	C	Q	H	G	G	A	G	C	T	T	C	A	G	G	A	T	C		Aox1
130	G	C	T	G	G	C	A	G	C	T	T	G	T	G	T	G	G	G	G	T	C	A	G	C	T	T	C	A	G	C	T	T	C	A	G	Aox2
		L	L	G	S	M	S	G	L	V	C	G	A	Q	R	R	L	P	A	H	T	A	F	A	R	S	H									
		exon 1																																		
		exon 2																																		
214	A	T	G	A	V	S	T	P	A	A	S	C	T	C	C	P	G	H	K	P	A	A	T	H	A	P	P	T	R	L		Aox1				
210	C	C	A	G	G	C	C	T	G	A	C	A	G	C	T	C	C	C	C	C	C	C	T	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Aox2		
		G	T	A	T	G	H	A	G	I	V	G	G	A	G	L	S	H	V	K	D	A	A	Q	A	F	G	A								
		exon 1																																		
		exon 2																																		
294	G	A	C	C	T	C	A	A	G	C	C	C	G	C	C	A	V	A	P	H	P	G	I	N	P	A	R	M	A	A		Aox1				
290	A	A	C	C	A	G	T	C	T	C	T	C	G	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Aox2			
		N	Q	S	S	S	S	P	S	F	A	T	S	G	V	A	P	H	P	G	M	K	A	P	S	P	P	T								
		exon 2																																		
		exon 2																																		
374	C	G	A	C	A	G	C	C	T	C	C	C	C	C	C	A	S	G	D	A	A	L	A	E	S	Y	M	A	H	P	A	Y	S		Aox1	
370	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	C	A	A	G	T	C	A	A	G	T	C	A	A	G	T	C	A	A	G	T	C	A	A	G	Aox2	
		D	E	V	E	A	C	W																					R	P	V	Y	D			
		exon 2																																		
		exon 3																																		
454	A	C	E	Y	V	E	S	V	R	P	T	H	V	T	P	Q	K	L	H	Q	H	V	G	L	R	T	I	Q					Aox1			
411	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	Aox2		
		T	A	Y	L	E	K	V	K	P	F	H	I	T	P	E	R	L	Y	Q	R	I	G	F	R	A	I	M								
		exon 3																																		
		exon 4																																		

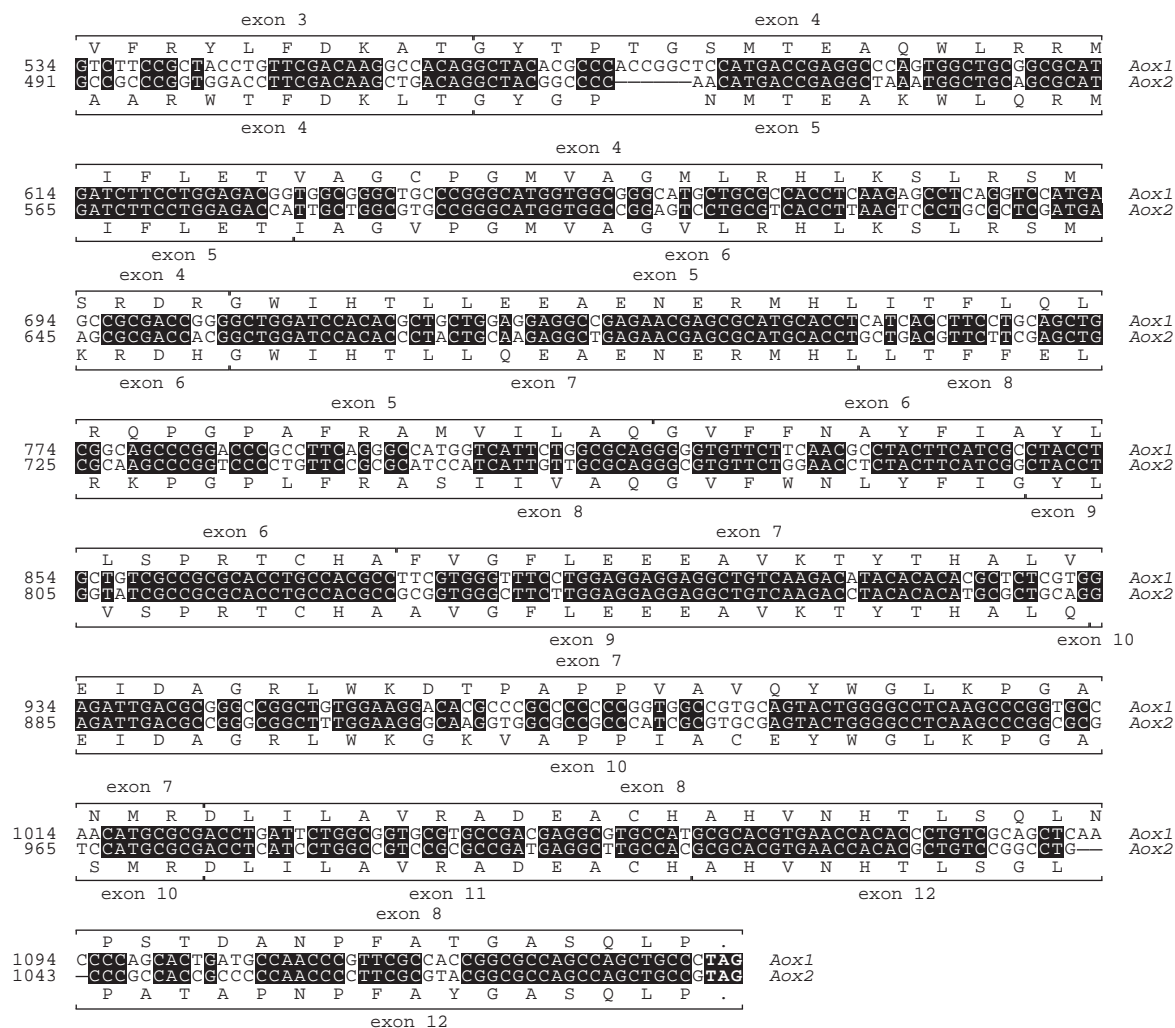


FIG. 4.5. Alignement des exons homologues des gènes *Aox1* et *Aox2*. Les codons initiateur (ATG) et terminateur (TAG) sont en caractères gras, tandis que les nucléotides conservés entre les deux séquences sont imprimés sur fond noir. Les positions des *gaps* sont reprises de la Figure 2 de Dinant et al. (2001).

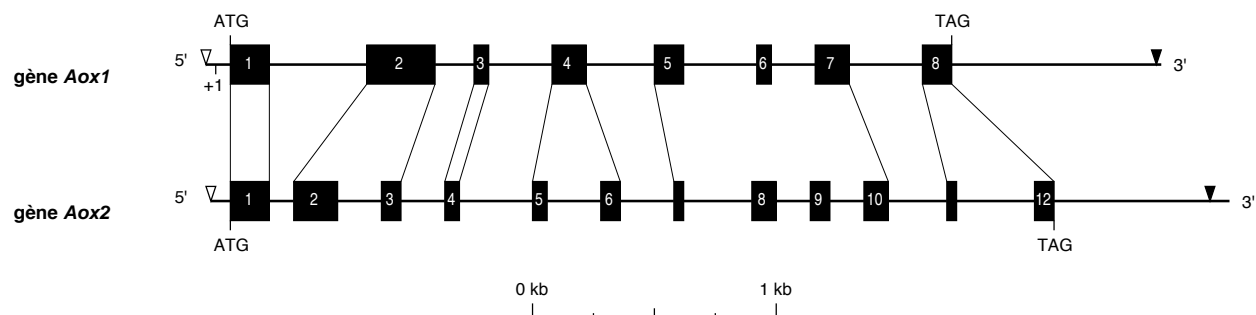


FIG. 4.6. Structures comparées des gènes *Aox1* et *Aox2*. Les exons sont montrés sur fond noir, tandis que les régions non traduites (introns, 5'- et 3'-UTRs) sont représentées par des lignes épaisses. Les positions des TATA boxes et des signaux présumés de polyadénylation sont respectivement indiquées par des triangles sur pointe ouverts (▽) ou pleins (▼). L'origine de transcription (+1) du gène *Aox1* est située 62 pb en amont du codon initiateur (ATG). Les exons homologues sont connectés par des lignes minces.

Chapitre 5

Étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Aox1*

La régulation de l'oxydase alternative (AOX) chez les plantes supérieures et les champignons est un phénomène complexe qui implique à la fois des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels (voir Introduction, chapitre 2, section 2.5.1). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, deux gènes *Aox* ont été identifiés, les transcrits du gène *Aox1* étant beaucoup plus abondants que ceux du gène *Aox2* (voir Introduction, chapitre 3, section 3.3.2).

Ayant déterminé la séquence du gène *Aox1* de *C. reinhardtii* au chapitre précédent, nous pouvions dès lors envisager d'en étudier la régulation transcriptionnelle à l'aide d'un système rapporteur. Par rapport à l'analyse de transcrits sur *Northern blots*, cette approche est extrêmement aisée à mettre en œuvre et permet d'examiner l'expression du gène dans les conditions les plus variées (revue par Kindle 1998; Davies et Grossman 1998; Grossman 2000).

5.1 Construction du plasmide *Aox1/Ars*

Durant la dernière décennie, la communauté des chercheurs utilisant *Chlamydomonas* comme modèle expérimental a développé plusieurs systèmes rapporteurs qu'on peut classer en trois catégories :

1. les protéines complétant une mutation, telles que la nitrate réductase (NIA1 ou NIT1), première enzyme de la voie d'assimilation du nitrate (Fernandez et al. 1989; Blankenship et Kindle 1992), et la *Radial Spoke Protein 3* (RSP3) qui restaure la motilité d'un mutant *pf14* aux deux flagelles paralysés (Diener et al. 1990; Zhang et Lefebvre 1997);

2. les polypeptides bioluminescents, représentés par la *Green Fluorescent Protein* (GFP) synthétique (Fuhrmann et al. 1999) et la luciférase de *Renilla reniformis* (Minko et al. 1999);
3. les enzymes inductibles (préférentiellement excrétées) à l'activité aisément détectable, telles que l'arylsulfatase (de Hostos et al. 1989; Davies et al. 1992), la phosphatase alcaline extracellulaire (Quisel et al. 1996) et la protochlorophyllide réductase (Li et Timko 1996).

5.1.1 Intérêt de l'arylsulfatase comme gène rapporteur

Parmi ces alternatives, un système de choix est celui qui fait appel à l'arylsulfatase (ARS), une enzyme périplasmique hydrolysant les substrats organiques sulfatés. Communément produite par les microorganismes du sol en situation de déficit soufré, l'ARS de *C. reinhardtii* est sévèrement réprimée en présence de faibles concentrations de sulfate inorganique (Lien et al. 1975; Schreiner et al. 1975; de Hostos et al. 1988).

Chez une souche dépourvue de paroi, 90% de l'enzyme produite est excrétée dans le milieu de culture (de Hostos et al. 1988). L'activité de l'ARS est aisément mesurable en utilisant divers substrats chromogéniques, tels que le *p*-nitrophénylsulfate (Lien et al. 1975; de Hostos et al. 1988), le 5-bromo-4-chloro-3-indolylsulfate (Davies et al. 1992) ou l' α -naphthylsulfate (Ohresser et al. 1997).

Le meilleur de ces substrats est sans conteste l' α -naphthylsulfate. Conférant une excellente sensibilité au dosage enzymatique, il présente en outre l'avantage de permettre la détection de l'activité ARS *in situ*, au niveau des colonies. L' α -naphthol issu de

l'hydrolyse de l' α -naphtylsulfate réagit avec l'orthodanisidine tétra-azotée pour donner naissance à un composé pourpre, insoluble dans l'eau, mais soluble dans le SDS (Ohresser et al. 1997).

Le cDNA et le gène *Ars* ont tous deux été clonés (de Hostos et al. 1989; Davies et al. 1992), mais la grande stabilité de la protéine ARS (Schreiner et al. 1975) n'en fait pas un rapporteur idéal pour examiner l'expression de gènes qui, comme le gène *CabII-1* (*Lhcb1*, *LhcII-1.1*), sont soumis à une régulation cyclique (Jacobshagen et al. 1996; Hahn et Kuck 1999). En revanche, l'ARS a été utilisée avec succès lors de l'étude de nombreux processus cellulaires :

- ▷ la régénération des flagelles impliquant les gènes *TubA1* (Periz et Keller 1997) et *TubB2* (Davies et al. 1992; Davies et Grossman 1994) qui encodent deux types de tubulines;
- ▷ la réponse à la carence en cuivre au travers de l'expression des gènes *Pcy1*, *Cyc6* et *Cpx1* (Quinn et Merchant 1995, 1998, 1999; Quinn et al. 1999, 2000, 2002) encodant respectivement la plastocyanine, le cytochrome c_6 et la coprogène oxydase;
- ▷ le mécanisme de concentration du CO_2 assuré par les gènes *Ca1* (Villand et al. 1997) et *Cah1* (Kucho et al. 1999) encodant des anhydrases carboniques mitochondriale et périplasmique;
- ▷ l'assimilation du nitrate faisant intervenir le gène *Nia1* (Ohresser et al. 1997; Loppes et al. 1999; Loppes et Radoux 2001, 2002; Llamas et al. 2002) qui encode la nitrate réductase;
- ▷ la voie des pentoses phosphates liée à l'expression du gène *Csbp* qui encode la sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (Hahn et al. 1998);
- ▷ les réponses au stress oxydant au travers du gène *Gpxh* encodant la glutathion peroxidase (Leisinger et al. 2001).

5.1.2 Stratégie de construction

Dans un premier temps, un segment de 1522 pb couvrant la région intergénique *Nrt2;3-Aox1* et comprenant l'ATG des deux gènes a été amplifié par PCR à l'aide des amorces NRT23-5'R et MDRP4 (Figure 5.1-A; p. 36). Ce fragment (ci-après appelé "promoteur *Aox1*" pour des raisons de commodité, mais incluant à la fois les régions promotrices des gènes *Nrt2;3* et *Aox1*) a été cloné au site *EcoRV* (modifié pour le *T/A cloning*) du vecteur pGEM-T Easy et sa séquence déterminée sur les deux brins (voir chapitre 6, Figure 6.2).

Tirant parti d'un site unique *NruI* localisé 3 pb en amont du codon initiateur du gène *Aox1*, un fragment de 1424 pb correspondant à la totalité du promoteur a été extrait du vecteur de clonage par double digestion *EcoRI-NruI* (Figure 5.1-B, p*Aox1*).

Après purification sur gel et obtention d'extrémities franches, le promoteur *Aox1* a été inséré au site *SalI* du plasmide pJD54 par transformation dans la souche DH5 α d'*Escherichia coli*. Ce plasmide dérivé du pBluescript KS+ porte le gène *Ars* (7 kb) dépourvu de promoteur, mais précédé d'un site unique *SalI* situé 101 pb en amont de l'ATG (Davies et al. 1992; Figure 5.1-B, pJD54).

À l'issue du criblage de 36 colonies transformantes par amplification de la zone de jonction *Aox1-Ars*, sept clones positifs ont été identifiés, puis contrôlés par double digestion *PstI-SalI* et par simple restriction *XmnI* (données non montrées). La zone de jonction *Aox1-Ars* de quatre plasmides aux profils identiques a ensuite été vérifiée par séquençage et l'une des constructions (Figure 5.1-C) sélectionnée pour la suite de ce travail.

Dénommée *Aox1/Ars*, cette construction chimérique doit générer un transcrit débutant par une 5'-UTR de 160 nucléotides (nt) de long, dont 60 nt issus du gène *Aox1* et 69 nt originaires du gène *Ars* (Figure 5.1-C; voir aussi Annexe B.2.1).

5.2 Transformation de *Chlamydomonas reinhardtii*

Après linéarisation par *KpnI* (Figure 5.1-C), la construction *Aox1/Ars* a été introduite dans la souche 325 (*arg*⁻) de *C. reinhardtii* par co-transformation avec le plasmide pASL. Six expériences parallèles mettant en jeu des quantités croissantes d'ADN co-transformant (0,5 à 5 μg) ont été réalisées. Le plasmide pJD54 (gène *Ars* dépourvu de promoteur) a été utilisé comme témoin négatif. Les colonies prototrophes devenues indépendantes de l'arginine ont été sélectionnées après une semaine de culture sur milieu TAP gélosé.

En vue de déterminer le pourcentage de transformants *arg*⁺ exprimant l'ARS (taux de co-expression) en fonction de la quantité d'ADN co-transformant, 60 à 120 colonies ont été sélectionnées au hasard dans chaque expérience, transférées sur milieu frais, puis soumises après trois jours à une détection enzymatique dans le milieu de culture (voir Matériel et Méthodes, chapitre 9, section 9.3.1). Aucune colonie issue des co-transformations avec pJD54 ne

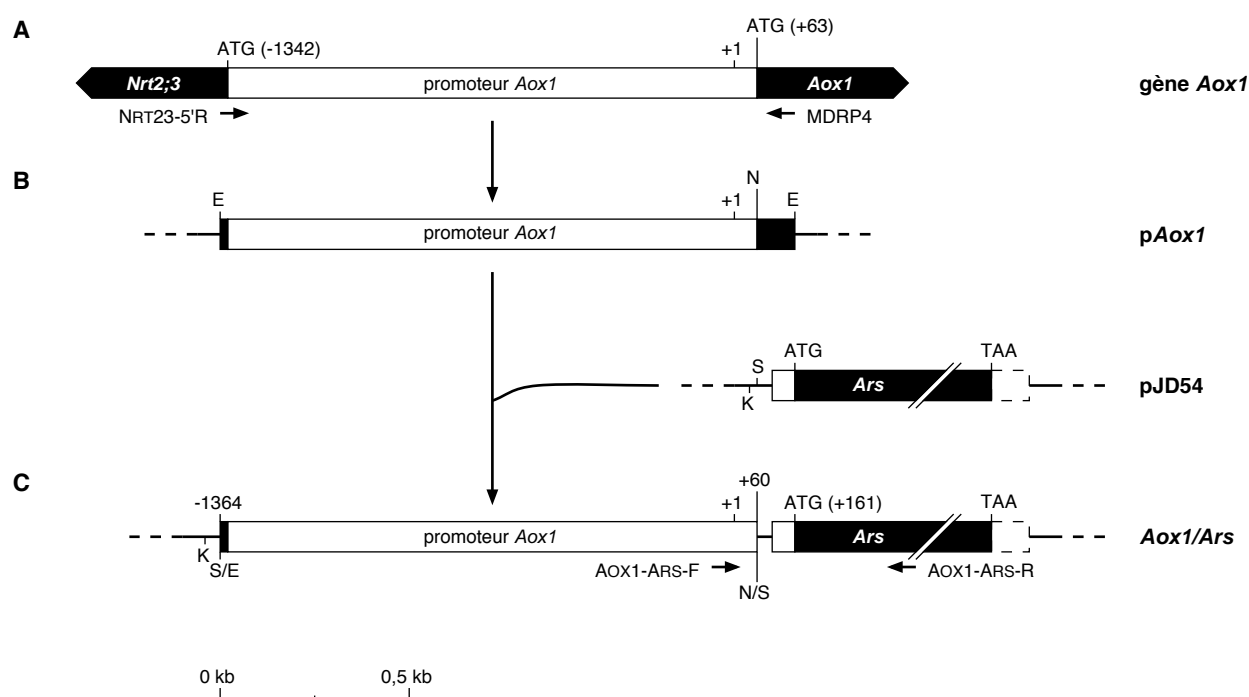


FIG. 5.1. **Stratégie de construction du plasmide *Aox1/Ars*.** La numérotation est relative à l'origine de transcription du gène *Aox1* (+1; Dinant et al. 2001). E : site *EcoRI*; K : site *KpnI*; N : site *NruI*; S : site *SalI*; N/S : jonction *NruI-SalI*; S/E : jonction *SalI-EcoRI*. **A.** Représentation schématique de la région intergénique *Nrt2;3-Aox1* montrant la position des amorces NRT23-5'R et MDRP4 (correspondant aux codons 32 à 25 du cDNA *Aox1*; GenBank AF047832; Dinant et al. 2001) utilisées pour son amplification. **B.** Représentation schématique du promoteur *Aox1* et du plasmide pJD54, porteur du gène *Ars* dépourvu de région promotrice. **C.** Représentation schématique de la construction *Aox1/Ars* montrant la position des amorces AOX1-ARS-F et AOX1-ARS-R utilisées pour l'amplification et le séquençage de la zone de jonction *Aox1-Ars*.

présente d'activité ARS (Figure 5.2-A). En revanche, de nombreuses colonies obtenues avec la construction *Aox1/Ars* produisent l'enzyme, quoiqu'à des niveaux très divers (Figure 5.2-B). Variant de 6 à 39%, le taux de co-expression augmente avec la quantité d'ADN co-transformant (Figure 5.3).

Ces résultats montrent que le promoteur *Aox1* est capable de promouvoir la synthèse de l'ARS en quantité suffisante pour en détecter l'activité *in situ*. Seize transformants choisis pour leurs niveaux d'expression variés (clones 1 à 16), ainsi que deux témoins négatifs d'expression nulle (T1 et T2), ont été conservés pour la suite de l'étude.

5.3 Analyse moléculaire des transformants

Chez *C. reinhardtii*, l'insertion d'ADN transformant a lieu par recombinaison en des sites apparemment

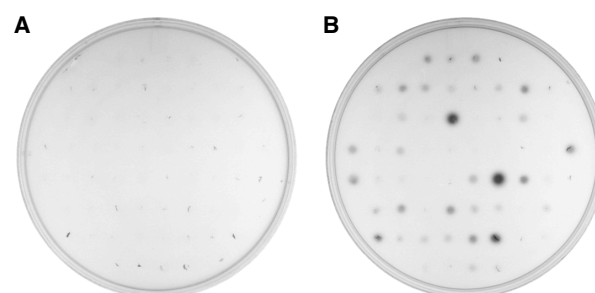


FIG. 5.2. **Détection *in situ* de l'activité ARS de transformants *arg*⁺ après trois jours de culture sur milieu TAP gélosé.** Durée de la coloration : 1 h. **A.** Co-transformation avec 5 µg du plasmide pJD54 (gène *Ars* dépourvu de promoteur). **B.** Co-transformation avec 5 µg de la construction chimérique *Aox1/Ars*.

aléatoires du génome. Les intégrations multiples, liées ou non, sont par ailleurs fréquentes. Enfin, de

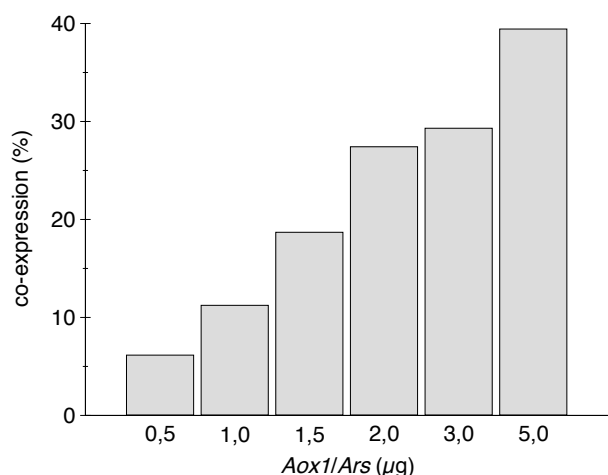


FIG. 5.3. Effet de la quantité d'ADN *Aox1/Ars* sur le pourcentage de transformants *arg*⁺ exprimant l'ARS (60 à 120 colonies analysées dans chaque cas).

petites délétions terminales peuvent survenir lors de l'intégration des constructions linéarisées (revue par Kindle 1998).

Avant d'étudier la régulation du gène *Ars* sous le contrôle du promoteur *Aox1*, nous avons entrepris l'analyse moléculaire des 16 clones retenus à la section 5.2. Notre objectif était notamment d'identifier un transformant porteur d'une copie unique et intacte de la région promotrice de la construction chimérique. Un tel clone offre la possibilité de transmettre la construction *Aox1/Ars* selon un mode mendélien simple lors d'un croisement et permet donc de construire de nouvelles souches de *C. reinhardtii* possédant des marqueurs susceptibles d'influencer la transcription du promoteur *Aox1*.

5.3.1 Détection de la construction *Aox1/Ars* par hybridation sur Southern blot

En vue d'évaluer le nombre de copies de la construction chimérique intégrées dans le génome des transformants, les 16 clones ont été analysés par hybridation sur *Southern blot* en utilisant comme sonde un fragment *Sal*I-*Sal*I de 1219 pb localisé dans le promoteur *Aox1* (Figure 5.4-A; p. 38).

Après purification, les ADNs totaux ont été digérés par *Hinf*I, enzyme disposant d'un seul site de restriction dans le promoteur *Aox1*. Cette digestion libère un fragment de 1385 pb correspondant à la majorité du promoteur *Aox1* endogène (Figure

5.4-A), ainsi qu'un ou plusieurs fragments additionnels de taille variable selon la position du site génomique *Hinf*I le plus proche, dans le cas du ou des inserts *Aox1/Ars* (Figure 5.4-B).

Une fois séparés par électrophorèse, les produits de digestion ont été transférés sur une membrane de nylon et hybridés à la sonde radioactive. Comme attendu, un signal à 1,4 kb correspondant au fragment endogène est visible chez les 16 transformants *Aox1/Ars*, de même que chez les deux témoins négatifs (T1 et T2) et la souche réceptrice (325) non transformée (Figure 5.5).

Chez les 16 transformants *arg*⁺ exprimant l'ARS, une ou plusieurs bandes supplémentaires sont reconnues par la sonde. S'échelonnant approximativement de 0,4 à 6,5 kb, chacune de ces bandes doit résulter de l'intégration d'une copie intacte ou partiellement délétée de la construction chimérique (Figure 5.5; toutes les bandes mentionnées dans le texte et le Tableau 5.1 ne sont pas nécessairement visibles sur la reproduction de l'autoradiographie).

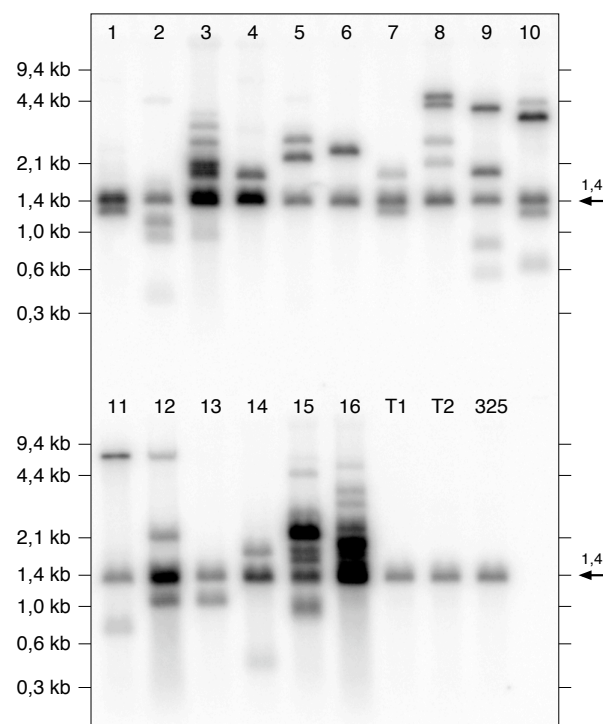


FIG. 5.5. Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *Sal*I-*Sal*I après restriction par *Hinf*I, électrophorèse et *Southern blotting* des ADNs totaux. Le signal du fragment endogène (1,4 kb) est indiqué par une flèche. 1 à 16 : transformants *Aox1/Ars*; T1 et T2 : témoins négatifs ; 325 : souche réceptrice 325.

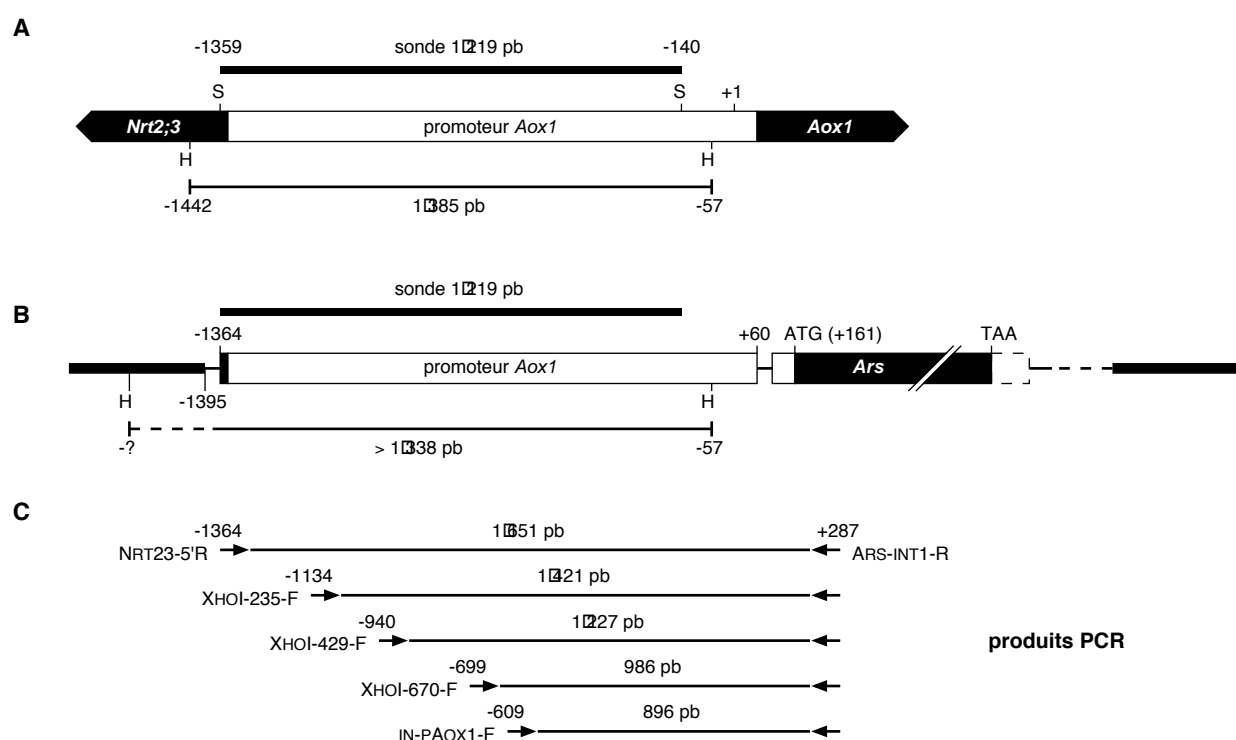


FIG. 5.4. **Stratégie d'analyse moléculaire des transformants *Aox1/Ars*.** La numérotation est relative à l'origine de transcription (+1). H : site *Hinf* I; S : site *Sal* I. **A.** Représentation schématique du segment *Nrt2;3-Aox1* endogène montrant la taille et la localisation de la sonde (1219 pb) utilisée pour l'hybridation sur *Southern blot*, ainsi que celles du fragment (1385 pb) détectable par la sonde après digestion par *Hinf* I. **B.** Représentation schématique de la région d'intégration de la construction *Aox1/Ars* dans le génome de *C. reinhardtii* montrant la localisation du fragment additionnel (> 1338 pb) détecté par la sonde chez un transformant (la position du site génomique *Hinf* I à gauche est arbitraire). **C.** Taille et localisation des produits d'amplification de la zone de jonction *Aox1-Ars* obtenus à l'aide de diverses amorces symbolisées par des flèches.

Il est intéressant de souligner qu'en dépit d'au moins deux événements d'intégration, le clone 2 ne contient apparemment aucune copie intacte du promoteur *Aox1* puisque les fragments surnuméraires détectés sont d'une taille inférieure à 1,3 kb. De même, l'unique copie du clone 13 est elle aussi vraisemblablement tronquée (Figure 5.5), ce qui suggère qu'un promoteur de taille réduite permet l'expression du gène *Ars*. À l'inverse, le clone 6 ne paraît porter qu'une copie unique et non déletée de la construction *Aox1/Ars* (fragment de ~2,5 kb).

5.3.2 Analyse de la taille approximative du promoteur de la construction *Aox1/Ars* chez les transformants

Dans un premier temps, nous avons envisagé d'amplifier le fragment contenant la zone de jonction *Aox1-Ars* précédée de la totalité de la région pro-

motrice (1,4 kb). À l'aide des amorces NRT23-5'R et ARS-INT1-R (Figure 5.4-C), un produit unique de 1,7 kb a été détecté chez dix des seize transformants examinés (Figure 5.6-A), indiquant que, dans ces clones, au moins l'une des copies de la construction *Aox1/Ars* s'est intégrée sans altération de la région promotrice *Aox1*.

Comme attendu, les deux témoins négatifs, de même que la souche 325 non transformée, ne présentent aucun signal. C'est également le cas des transformants 2, 7, 11 et 13, tandis que chez les clones 10 et 16, une ou plusieurs bandes de taille aberrante ont été détectées.

À l'aide des amorces IN-PAOX1-F et ARS-INT1-R (Figure 5.4-C), nous avons alors procédé pour les clones 2, 7, 10, 11, 13 et 16 à l'amplification d'un produit correspondant approximativement à la seconde moitié (3') du promoteur *Aox1* (0,7 kb) suivie de la zone de jonction *Aox1-Ars*. Le clone 3 a servi

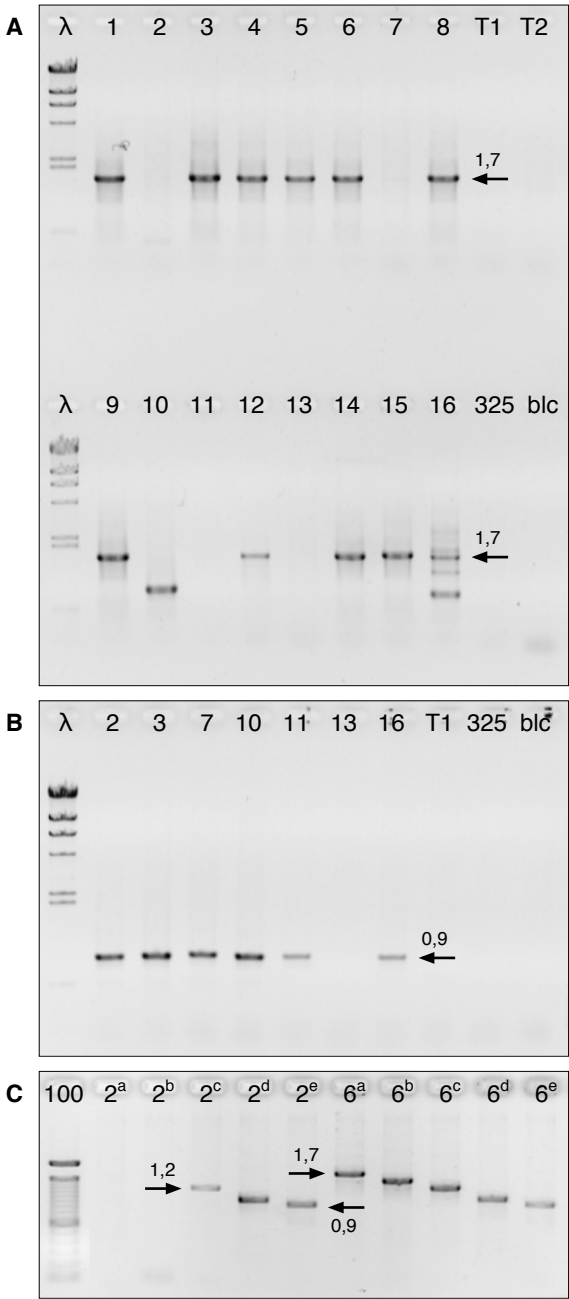


FIG. 5.6. Électrophorèses des produits PCR obtenus après amplification des ADN totaux. 1 à 16: transformants *Aox1/Ars*; T1 et T2: témoins négatifs; 325: souche réceptrice 325; λ : marqueur λ /*Hind* III; 100: marqueur 100 pb et multiples; blc: réaction sans ADN. A. Bandes amplifiées à l'aide des amorces NRT23-5'R et ARS-INT1-R. B. Bande amplifiée à l'aide des amorces IN-PAOX1-F et ARS-INT1-R. C. Bande amplifiée à l'aide de l'amorce NRT23-5'R (a), XHOI-235-F (b), XHOI-429-F (c), XHOI-670-F (d) ou IN-PAOX1-F (e) combinée à l'amorce ARS-INT1-R chez les transformants 2 et 6.

TAB. 5.1. Tableau récapitulatif des caractéristiques des 16 transformants *Aox1/Ars*. Évaluée deux fois sur milieu TAP gélosé, l'expression de l'ARS variait de faible (+) à intense (+++). ADN: quantité de plasmide *Aox1/Ars* utilisée en co-transformation; copies: nombre de copies de la construction chimérique évalué par hybridation sur *Southern blot*; taille: taille approximative du promoteur *Aox1* déterminée par PCR.

clone	expression	ADN (μ g)	copies	taille (kb)
1	+	0,5	1 à 2	1,4
2	++	1	2 à 4	$\geq 1,0$
7	+	1	2	$\geq 0,7$
3	+++	1,5	4 à 7	1,4
8	+	1,5	4	1,4
9	+	1,5	4	1,4
10	+	1,5	4 à 5	$\geq 0,7$
11	++	1,5	2	$\geq 0,7$
4	++	2	1 à 2	1,4
5	+++	2	2	1,4
12	++	2	3 à 4	1,4
13	+	2	1	$< 0,7$
14	++	2	2	1,4
6	++	3	1	1,4
15	+++	3	6 à 8	1,4
16	++	5	5 à 9	$\geq 0,7$

de témoin positif. Ainsi que le montre la Figure 5.6-B, une bande de 0,9 kb est présente chez cinq des six clones examinés (2, 7, 10, 11 et 16), de même que chez le témoin positif (clone 3).

À nouveau, aucun produit n'est obtenu chez le témoin négatif (clone T1), ni chez la souche 325, tout comme chez le clone 13.

Ces résultats suggèrent donc que dix des seize clones retenus portent au moins une copie intacte du promoteur *Aox1*, tandis que cinq des six autres transformants n'en ont intégré qu'une ou plusieurs copies, soit tronquées dans leur première moitié (5'), soit recombinaées entre elles.

Enfin, dans le but d'évaluer plus précisément la taille du promoteur *Aox1* dans les constructions chimériques portées par le clone 2 (voir section 5.3.1), nous avons testé trois nouvelles combinaisons d'amorces (Figure 5.4-C) à même d'amplifier des produits de taille intermédiaire à ceux déjà obtenus au cours des deux PCRs précédentes. Le clone 6, porteur d'une copie intacte du promoteur *Aox1*, a été pris comme témoin positif.

Conformément à notre attente, l'analyse du clone 6 donne lieu à la détection de la bande prévue avec les cinq couples d'amorces (Figure 5.6-C). Par contre, chez le clone 2, l'impossibilité d'amplifier un segment dépassant 1,2 kb atteste de la présence de copies tronquées, dont l'une au moins possède un millier de nucléotides en amont de l'origine de transcription du gène *Ars*.

Le Tableau 5.1 récapitule l'essentiel des caractéristiques des 16 transformants étudiés. Nous n'observons pas de corrélation entre le nombre de copies intégrées d'une part et l'expression de l'ARS ou la quantité d'ADN co-transformant d'autre part.

Pour la suite de ce travail, nous avons retenu trois clones (2, 3 et 6) présentant chacun une bonne activité ARS, ainsi qu'un témoin négatif (T1). Le clone 6 est le seul à posséder une copie unique et intacte de la construction *Aox1/Ars*, alors que le clone 3 porte au moins une copie intacte parmi quatre à sept événements d'intégration. Quant au clone 2, il a intégré un minimum de deux copies tronquées, dont l'une au moins dispose d'un promoteur *Aox1* de ~1,0 kb.

5.4 Étude de l'expression de la construction chimérique *Aox1/Ars*

5.4.1 Effet des inducteurs classiques de l'AOX

Chez de nombreuses espèces, l'abondance et l'activité de l'AOX sont plus importantes dans diverses conditions de stress ou lorsque la respiration mitochondriale sensible au cyanure est déficiente (voir Introduction, chapitre 2, section 2.4.2). En vue d'aborder l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Aox1* chez *C. reinhardtii*, des cellules du clone 6 ont été cultivées pendant 8 h en milieu TAP_{NH4} liquide additionné de divers agents de stress, inhibiteurs et métabolites susceptibles de stimuler la voie alternative. À l'issue de ces cultures, les suspensions cellulaires ont été congelées et conservées à -20°C jusqu'à ce que l'activité ARS soit mesurée. Les résultats (Tableau 5.2, colonne TAP_{NH4}) montrent que la plupart des traitements réalisés se sont avérés incapables d'affecter significativement la transcription de la construction chimérique. Tant les sels que le peroxyde d'hydrogène et les acides salicylique et citrique semblent influencer plutôt négativement l'expression de l'ARS,

tandis que le paraquat donne lieu à un effet légèrement positif. De même, l'antimycine A et le myxothiazol, deux inhibiteurs du complexe III bloquant la voie des cytochromes, conduisent à une modeste stimulation de l'expression, nettement plus faible que celle rapportée chez les plantes supérieures et les champignons. C'est aussi le cas pour la roténone, inhibiteur du complexe I. L'effet du cyanure de potassium (KCN), inhibiteur du complexe IV, n'a pu être étudié car ce composé inhibe l'ARS elle-même (données non montrées ; voir aussi Lien et al. 1975).

TAB. 5.2. **Activité ARS (relative) du clone 6 cultivé pendant 8 h en milieu TAP_{NH4} ou TAP_{NO3} liquide additionné de divers agents de stress, inhibiteurs et métabolites susceptibles de stimuler la voie alternative.** Chaque valeur est le résultat d'au moins deux expériences indépendantes. Les activités moyennes des cultures témoins en milieux TAP_{NH4} et TAP_{NO3} valaient respectivement 500 et 2500 nmol naph h⁻¹ mg prot⁻¹. Comparativement aux témoins, la réduction de croissance variait de 25 à 50 %, hormis en *a* (réduction de plus de 75 %) et en *b* (réduction de moins de 10 %). n.d. : activité non déterminée.

agent, inhibiteur, métabolite	conc.	activité relative	
		TAP _{NH4}	TAP _{NO3}
aucun		1,0	1,0
stress salin			
▷ chlorure de lithium	10 mM ^a	0,4	n.d.
▷ chlorure de sodium	100 mM	0,6	n.d.
▷ chlorure de potassium	100 mM	0,8	n.d.
stress osmotique			
▷ mannitol	400 mM ^a	1,0	n.d.
stress oxydant			
▷ paraquat	200 nM	1,3	1,0
▷ <i>tert</i> -butyl hydroperoxyde	100 μM	1,0	1,0
▷ peroxyde d'hydrogène	1 mM	0,7	1,0
métaux lourds			
▷ cuivre	100 μM	1,0	1,4
▷ cadmium	100 μM	1,0	1,0
inhibiteurs respiratoires			
▷ roténone	40 μM ^b	1,2	0,7
▷ antimycine A	2 μM	1,2	0,7
▷ myxothiazol	6 μM	1,3	0,8
métabolites			
▷ cystéine	1 mM ^b	1,0	1,0
▷ acide salicylique	1 mM	0,8	1,0
▷ acide citrique	5 mM	0,7	1,0

Des résultats similaires ont été obtenus avec le clone 3, puis au cours d'expériences d'une durée de 24 h avec les clones 3 et 6 (données non montrées).

Puisque l'expression de la construction *Aox1/Ars* s'est révélée par la suite beaucoup plus élevée en présence de nitrate employé comme source d'azote (voir section 5.4.3), l'activité ARS du clone 6 en réponse à la plupart de ces agents a été réexaminée après 8 h de culture en milieu TAP_{NO3} (Tableau 5.2, dernière colonne). Ici encore, les différents traitements réalisés n'affectent guère l'expression de la construction chimérique.

En résumé, la régulation transcriptionnelle du gène *Aox1* chez *C. reinhardtii* paraît très différente de celle observée chez de nombreuses espèces de plantes supérieures et de champignons.

5.4.2 Effet des mutations *dum*

À côté des inhibiteurs testés à la section 5.4.1, une inactivation des gènes qui encodent des composants des complexes respiratoires est susceptible d'induire ou de stimuler l'expression de l'AOX (voir Introduction, chapitre 2, section 2.4.2). Notre laboratoire disposant d'une riche collection de mutants mitochondriaux (*dum*) affectés dans l'un ou plusieurs de ces complexes (voir Introduction, chapitre 3, section 3.2.2), il était intéressant d'étudier l'expression de la construction chimérique dans ce contexte génétique particulier.

Possédant une copie unique et intacte de la construction *Aox1/Ars* (voir section 5.3), le clone 6 était le candidat idéal à l'introduction d'un génome mitochondrial de type *dum*. Nous avons donc croisé ce clone avec cinq souches porteuses de diverses mutations *dum*: 235 (*dum20*), 228 (*dum25*), 166 (*dum2*), 239 (*dum19*) et 283 (*dum24*), affectant respectivement des constituants du complexe I (*dum20* et *dum25*), du complexe III (*dum2*), du complexe IV (*dum19*) et des complexes I + III (*dum24*). Il nous fallait alors sélectionner les descendants présentant la mutation *dum* associée aux caractères distinctifs du clone 6, à savoir l'absence de paroi (*cw15*), la prototrophie vis-à-vis de l'arginine (*arg7*⁺), la capacité d'assimilation du nitrate (*nia1*⁺) et la présence de la construction chimérique.

Afin de récupérer directement les marqueurs *nia1*⁺ et *arg7*⁺, les spores méiotiques ont été étalées sur milieu TAP_{NO3} gélosé dépourvu d'arginine. Pour chaque croisement, environ 25 colonies phénotypiquement sans paroi ont été analysées du point de vue de leur incapacité de croissance à l'obscurité.

Comme attendu pour des parents *dum* de type sexuel *mt*⁻, la transmission des génomes mitochondriaux mutants était de presque 100 % parmi les descendants examinés (Matagne et al. 1988). Après identification des clones ayant hérité de la construction *Aox1/Ars* par détection *in situ*, deux descendants de chaque croisement ont été sélectionnés. Le caractère *dum* de certains d'entre eux a ensuite été confirmé par dosage enzymatique du complexe altéré (*dum20*, *dum25*) ou par amplification et séquençage de la région génique mutée (*dum19*).

Les activités ARS des descendants *dum* cultivés en milieu TAP_{NH4} ou TAP_{NO3} liquide ont été déterminées et comparées à celles du clone 6 (Tableau 5.3). Après 8 h, les mutations se sont avérées neutres (*dum25*) ou négatives (*dum20*, *dum19* et *dum24*) vis-à-vis de l'expression de l'ARS, tandis qu'une légère stimulation était parfois observée après 24 h.

Dans le but de confirmer cet éventuel effet positif, un génome mitochondrial de type *dum25* a été transmis au clone 6 par cytoduction. Cette technique permet d'introduire un nouveau génome extrachromosomique sans modifier le génome nucléaire du parent récepteur (voir Matériel et Méthodes, chapitre 9, section 9.2.4). Après croisement avec la souche 629, deux cytoductants *dum25* et deux clones témoins non porteurs de la mutation mitochondriale ont été

TAB. 5.3. Activités ARS (relatives) de descendants *dum* du clone 6 cultivés pendant 8 ou 24 h en milieu TAP_{NH4} ou TAP_{NO3} liquide. Chaque valeur est le résultat d'au moins deux expériences indépendantes. Les activités moyennes du clone 6 après 8 h de culture en milieu TAP_{NH4} et TAP_{NO3} valaient respectivement 550 et 2400 nmol naph h⁻¹ mg prot⁻¹, contre 850 et 1800 après 24 h. n.d. : activité non déterminée.

génotype	activité (8 h)		activité (24 h)	
	TAP _{NH4}	TAP _{NO3}	TAP _{NH4}	TAP _{NO3}
clone 6	1,0	1,0	1,0	1,0
complexe I				
▷ <i>dum20</i>	1,0	0,8	1,0	1,8
▷ <i>dum25</i>	1,0	1,0	1,8	1,7
complexe III				
▷ <i>dum2</i>	1,0	n.d.	1,0	n.d.
complexe IV				
▷ <i>dum19</i>	1,0	0,4	1,0	1,0
complexes I + III				
▷ <i>dum24</i>	1,0	0,8	1,3	1,6

isolés. La présence ou l'absence du caractère *dum25* a été vérifiée par amplification et séquençage de la région génique concernée.

L'analyse de ces quatre clones cultivés pendant 16 h en milieu TAP_{NH4} ou TAP_{NO3} liquide n'a toutefois révélé aucune différence tranchée quant à l'expression de l'ARS (données non montrées).

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure qu'à l'instar des inhibiteurs respiratoires, les mutations *dum* ne sont pas en mesure de modifier notablement la transcription du gène *Ars* placé sous le contrôle du promoteur *Aox1*.

5.4.3 Effet de la source d'azote

Comme mentionné au chapitre 4, section 4.1, l'expression du gène *Aox1* de *C. reinhardtii* est réprimée par l'ammonium et stimulée par le nitrate (Quezada et al. 1998b, 2000). Ce type de régulation, jamais observée pour un gène *Aox* chez d'autres organismes, est typique des gènes liés à l'assimilation de l'azote, tels que le gène *Nia1* encodant la nitratre réductase (revue par Fernandez et al. 1998). Par ailleurs, le transcrit *Aox1*, quoique peu abondant, est bel et bien présent dans des cellules cultivées en présence d'ammonium (Dinant et al. 2001).

En vue d'approfondir l'étude de ce mode de régulation, nous avons mesuré les activités ARS des clones 2, 3 et 6 après 8 h de culture en milieu TAP liquide dépourvu ou additionné de différentes sources d'azote à 4 mM (Figure 5.7-A).

Par rapport à l'ammonium, la carence azotée conduit à une expression significativement plus élevée de la construction chimérique, tandis que le remplacement de l'ammonium par le nitrate a pour effet de multiplier l'activité enzymatique par un facteur quatre à cinq. En outre, la culture en présence de nitrate d'ammonium donne lieu à un niveau d'activité ARS intermédiaire, indiquant que l'ammonium et le nitrate exercent vraisemblablement des effets antagonistes sur le promoteur *Aox1*.

Afin d'examiner l'expression de la construction *Aox1/Ars* en réponse à des concentrations croissantes d'ammonium ou de nitrate, des cellules du clone 6 ont été maintenues pendant 8 h en milieu TAP liquide dépourvu d'azote ou contenant des concentrations variées de l'une ou l'autre source d'azote (Figure 5.7-B).

Alors que l'expression diminue lentement avec l'élévation de la concentration en ammonium jusqu'à descendre à un tiers du niveau obtenu en absence d'azote, l'activité ARS augmente spectaculai-

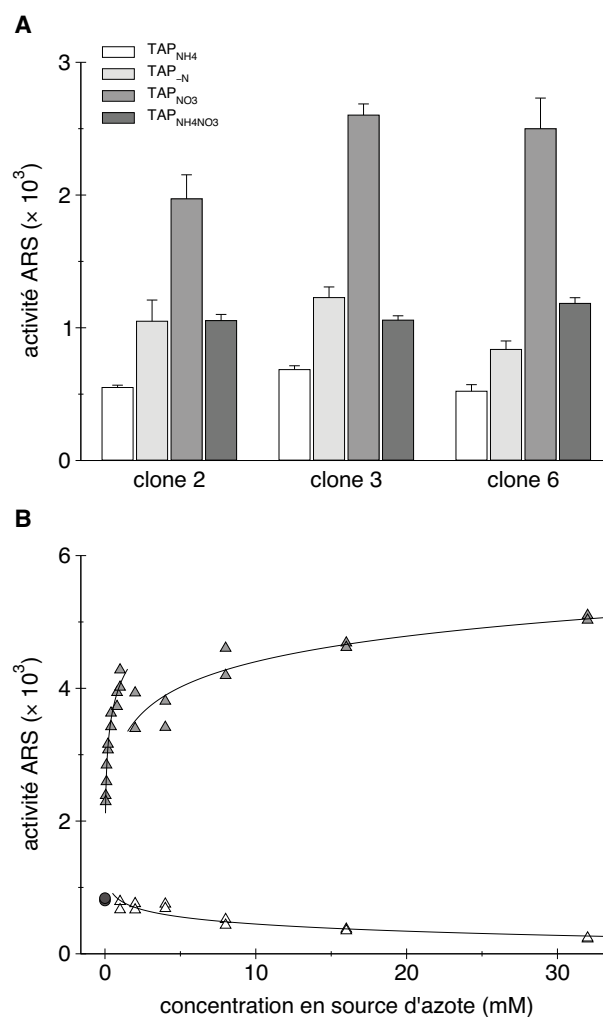


FIG. 5.7. Effets de la nature et de la concentration de la source d'azote sur l'expression de la construction chimérique *Aox1/Ars*. **A**. Activités ARS moyennes (nmol naph h⁻¹ mg prot⁻¹ ± erreur-type) des clones 2, 3 et 6 cultivés pendant 8 h en milieu TAP_{NH4}, TAP_N, TAP_{NO3} ou TAP_{NH4NO3} liquide (concentration en source d'azote: 4 mM; n = 4 pour les clones 2 et 3; n = 6 à 12 pour le clone 6). **B**. Activité ARS du clone 6 cultivé pendant 8 h soit en milieu TAP_N liquide (cercle sombre), soit en milieu TAP_{NH4} (triangles blancs) ou TAP_{NO3} (triangles gris) liquide contenant des concentrations croissantes de la source d'azote. Chaque symbole correspond à l'activité déterminée dans une expérience indépendante.

rement avec la concentration en nitrate, atteignant un niveau élevé (stimulation d'un facteur cinq) autour de 1 mM. Au-delà de cette molarité, l'accroissement devient nettement plus lent pour saturer à un niveau de stimulation de l'ordre de six fois.

Cette courbe biphasique de réponse au nitrate a également été observée avec le clone 3 (données non montrées). Son allure particulière sera commentée dans la Discussion (chapitre 7, section 7.3).

5.4.4 Effet de l'azoture de sodium

Lors de la recherche de traitements susceptibles de stimuler l'expression de la construction chimérique, nous avons également examiné l'effet d'un inhibiteur des métalloprotéines, l'azoture de sodium (NaN_3). Base conjuguée de l'acide azothydrique (HN_3), l'azoture (N_3^-) appartient comme le cyanure (CN^-) à la classe des ions pseudohalogénures. Son fort pouvoir de coordination des métaux en fait un inhibiteur compétitif de nombreuses enzymes à hème (fer) ou à centre cuivre.

Ainsi, l'azoture se fixe aisément à l'hème a_3 et au site Cu_B de la cytochrome c oxydase (complexe IV) en pontant le Fe(III) et le Cu(II) à la manière du cyanure (revue par Smith et Wilcox 1994). Ce composé est d'ailleurs utilisé occasionnellement à la place du cyanure pour bloquer le complexe IV et analyser la stimulation de la voie alternative (Kano et Kumazawa 1972 ; Sesay et al. 1986 ; Saisho et al. 2001b).

Comme le montre la Figure 5.8-A, l'activité ARS du clone 6 cultivé pendant 8 h en milieu TAP_{NH_4} ou TAP_{NO_3} liquide additionné de $200 \mu\text{M}$ d'azoture de sodium est approximativement deux fois plus élevée qu'en absence d'inhibiteur. Dans le cas du nitrate, nous avons en outre effectué des mesures après des traitements prolongés. Celles-ci ont révélé que la stimulation par l'azoture augmentait avec le temps pour atteindre un facteur 3,3 après 16 h et 5,6 après 24 h (données non montrées). Des observations similaires ont été obtenues avec le clone 3.

Par ailleurs, nous avons vérifié que l'addition d'azoture durant la réaction enzymatique ne modifie en rien l'activité ARS (données non montrées), démontrant que l'effet positif de l'azoture résulte bien d'une transcription accrue du gène *Aox1* plutôt que d'une activation de l'enzyme ARS.

Puisque ni l'antimycine A, ni le myxothiazol n'affectent l'expression de la construction chimérique (voir section 5.4.1), il est permis de penser que l'effet de l'azoture de sodium n'est pas lié au blocage de la voie des cytochromes, suite à l'inhibition de la cytochrome c oxydase. Nous avons d'abord mesuré *in vitro* l'activité de ce complexe enzymatique en présence de molarités croissantes d'azoture de sodium. La Figure 5.8-B montre qu'une concentration en azoture de $200 \mu\text{M}$ inhibe environ 75 % de l'activité

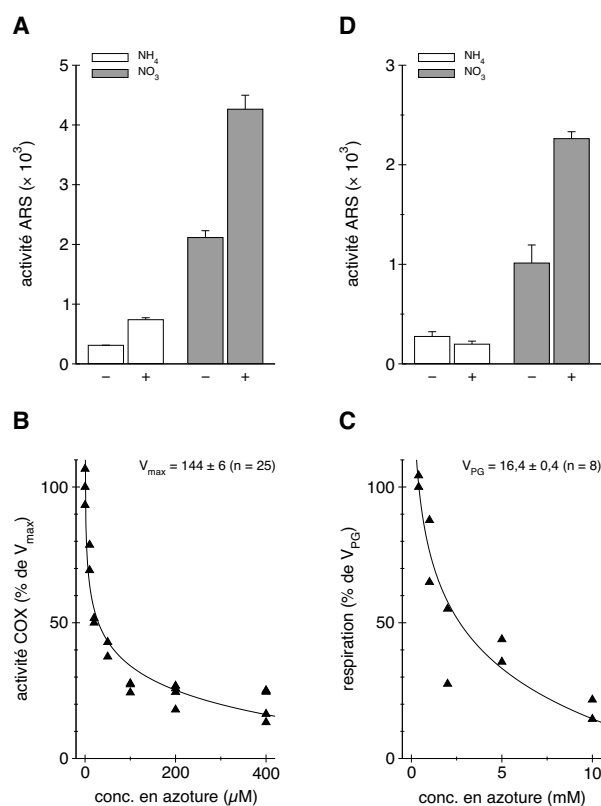


FIG. 5.8. Effet de l'azoture de sodium sur l'expression de la construction chimérique *Aox1/Ars* en relation avec le blocage de la voie des cytochromes. **A** et **D**. Activités ARS moyennes ($\text{nmol naph h}^{-1} \text{ mg prot}^{-1} \pm \text{erreur-type}$) du clone 6 (**A**) ou d'un descendant *dum19* (**D**) cultivé pendant 8 h en milieu TAP_{NH_4} ou TAP_{NO_3} liquide, en absence (-) ou en présence (+) d'azoture de sodium ($200 \mu\text{M}$; n = 4 à 5). **B**. Activité COX d'un extrait de la souche sauvage (83) en présence de concentrations croissantes d'azoture de sodium, exprimée en % de l'activité non inhibée (V_{max} , $\text{nmol cytc min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$; $I_{50} = 29,5 \mu\text{M}$). Chaque symbole correspond à l'activité déterminée dans une expérience indépendante. **C**. Respiration cellulaire résistante au n-propyl gallate de la souche sauvage (83) cultivée en présence de concentrations croissantes d'azoture de sodium. Les valeurs sont exprimées en % de la respiration résistante non inhibée (V_{PG} , $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} 10^{-7} \text{ cell}$; $I_{50} = 2,67 \text{ mM}$). Chaque symbole correspond à la respiration déterminée dans une expérience indépendante.

enzymatique. En revanche, la respiration cellulaire mesurée *in vivo* en présence de n-propyl gallate, inhibiteur de l'AOX, s'est avérée totalement résistante à des concentrations submillimolaires d'azoture (Figure 5.8-C). De même, la capacité de la voie des cytochromes n'est pas significativement réduite à l'issue de 16 h de culture en milieu TAP liquide addi-

tionné de 200 μM d'azoture de sodium, et ce indépendamment de la nature de la source d'azote (données non montrées). À l'inverse, tant aux niveaux enzymatique que respiratoire, le cyanure de potassium à 1 mM inhibe complètement l'activité de la cytochrome *c* oxydase (données non montrées).

Enfin, dans le cas d'un descendant *dum19* (déficient en cytochrome *c* oxydase) porteur de la construction *Aox1/Ars* (voir section 5.4.2), la présence de 200 μM d'azoture en milieu TAP_{NH_4} liquide n'a pas d'effet sur l'expression de l'ARS, tandis qu'en milieu TAP_{NO_3} , l'activité de cette dernière est doublée (Figure 5.8-D).

Considérés dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'effet de l'azoture sur l'expression de la construction chimérique (i) est particulièrement marqué en milieu contenant du nitrate et (ii) est largement indépendant de l'inhibition de la cytochrome *c* oxydase.

5.4.5 Effet de l'inactivation de la nitrate réductase

La nitrate réductase (NR) est la première enzyme de la voie d'assimilation du nitrate. Ses propriétés biochimiques et moléculaires chez *C. reinhardtii* sont similaires à celles de ses homologues chez les autres algues vertes et les plantes supérieures. Il s'agit d'un homodimère comportant deux sous-unités de 110 kDa, chacune d'entre elles étant associée à trois cofacteurs rédox : un dinucléotide de flavine-adenine (FAD), un cytochrome *b*₅₅₇ et un groupement prosthétique à molybdène (revue par Kleinhofs et al. 1989 ; Fernandez et al. 1998).

Lors de l'assimilation du nitrate, les électrons du NAD(P)H sont d'abord acceptés par le FAD, puis transmis au cytochrome *b*₅₅₇, qui les transfère à son tour à la molybdoptérine responsable de sa réduction en nitrite. Ce nitrite est ensuite réduit en ammonium par la nitrite réductase pour être finalement incorporé dans les voies de biosynthèse cellulaire par l'intermédiaire du glutamate (revue par Fernandez et al. 1998).

Comme mentionné brièvement à la section 5.4.3, la nitrate réductase de *C. reinhardtii* est encodée par le gène *Nia1*. Composant-clé du métabolisme azoté, son activité est étroitement régulée par des facteurs environnementaux qui sont principalement la lumière et la disponibilité en carbone et en azote. Ces facteurs semblent agir aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, de même que sur l'activité de l'enzyme. Au niveau transcriptionnel, l'expres-

sion du gène *Nia1* est réprimée par l'ammonium et stimulée par la lumière, l'acétate et le nitrate, sans doute *via* le produit du gène régulateur *Nit2* (revue par Fernandez et al. 1998 ; Loppes et al. 1999).

En raison de son cytochrome *b*₅₅₇ comportant un hème, la nitrate réductase est elle aussi inhibée par l'azoture de sodium (Guerrero et Gutierrez 1977). Comme l'effet de ce dernier sur l'expression de la construction *Aox1/Ars* est particulièrement marqué lors de cultures en présence de nitrate (voir section 5.4.4), il est permis de penser qu'une partie au moins de l'effet de l'azoture est liée à l'inhibition de la nitrate réductase.

La Figure 5.9-A montre effectivement que l'activité *in vitro* de la nitrate réductase est considérablement réduite par 200 μM d'azoture et totalement bloquée aux alentours de 300 μM . De façon remarquable, l'allure de cette courbe d'inhibition est en bon accord avec l'importante stimulation de l'expression de l'ARS causée par des molarités croissantes de cet inhibiteur à des cellules du clone 6 cultivées pendant 16 h en milieu TAP_{NO_3} (Figure 5.9-B). De plus, la croissance du clone 6 étant fortement réduite en milieu $\text{TAP}_{\text{NO}_3} + \text{NaN}_3$ et jamais en milieu $\text{TAP}_{\text{NH}_4} + \text{NaN}_3$ (Tableau 5.4), il est légitime de considérer que l'azoture affecte aussi l'activité *in vivo* de la nitrate réductase.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'effet positif de l'azoture dépend essentiellement de l'inhibition de la nitrate réductase.

En vue d'étayer cette hypothèse, nous avons choisi d'inactiver l'enzyme par substitution du tungstate au molybdate dans les milieux de culture. Il est en effet bien connu qu'en prenant la place

TAB. 5.4. Croissance du clone 6 cultivé pendant 8, 16 ou 24 h en milieu TAP_{NH_4} ou TAP_{NO_3} liquide, en absence (–) ou en présence (+) d'azoture de sodium. Les valeurs moyennes (\pm erreur-type) sont exprimées en % des concentrations initiales en protéines ($n = 6$ à 10 pour 8 et 16 h ; $n = 3$ pour 24 h). La concentration approximative à l'ensemencement (0 h) était de 50 $\mu\text{g/ml}$. n.d. : valeur non déterminée.

temps de culture	croissance TAP_{NH_4} (–)	croissance TAP_{NH_4} (+)	croissance TAP_{NO_3} (–)	croissance TAP_{NO_3} (+)
0 h	100	100	100	100
8 h	179 \pm 9	187 \pm 5	156 \pm 7	112 \pm 5
16 h	272 \pm 21	256 \pm 8	226 \pm 29	113 \pm 8
24 h	575 \pm 26	n.d.	588 \pm 6	194 \pm 9

du molybdène dans le cofacteur molybdoptérine, le tungstène conduit à l'inactivation de la nitrate réductase (Vega et al. 1971 ; Galvan et al. 1992 ; Loppes et al. 1999).

Des cellules du clone 6 ont donc été cultivées durant dix générations (3 à 4 jours) sur milieu TAP_{NH_4} gélosé additionné de molybdate ou de tungstate de sodium à 1 μM . Elles ont ensuite été transférées et cultivées pendant 16 h en milieu TAP_{NH_4} , TAP_{NO_3} ou $\text{TAP}_{\text{NO}_3} + \text{NaN}_3$ liquide, contenant chacun du molybdate ou du tungstate.

Comme le montre la Figure 5.9-C, le tungstate n'a aucun effet sur l'expression de l'ARS en milieu TAP_{NH_4} ou $\text{TAP}_{\text{NO}_3} + \text{NaN}_3$. En revanche, l'activité ARS est plus que doublée en milieu TAP_{NO_3} additionné de tungstate pour atteindre approximativement le niveau observé en présence d'azoture. Parallèlement, l'activité de la nitrate réductase et la croissance cellulaire sont toutes deux réduites d'environ 90 % (données non montrées).

Répétés avec le clone 3, ainsi qu'au cours d'expériences d'une durée de 8 h avec les clones 3 et 6 (données non montrées), ces résultats indiquent que l'inhibition de la nitrate réductase est bien responsable de l'effet positif de l'azoture de sodium en milieu TAP_{NO_3} .

Afin de prouver d'une autre manière l'implication de cette enzyme, nous avons croisé le clone 6 avec une souche *nia1* déficiente en nitrate réductase et sélectionné un produit méiotique portant à la fois la mutation *nia1* et la construction chimérique. Des cellules de ce descendant ont alors été cultivées sur milieu TAP_{NH_4} gélosé, puis transférées 8 h en milieu TAP_{NH_4} , TAP_{NO_3} ou $\text{TAP}_{\text{NO}_3} + \text{NaN}_3$ liquide.

Ainsi que le montre la Figure 5.9-D, l'activité ARS d'un descendant *nia1* est environ douze fois plus élevée en milieu TAP_{NO_3} qu'en milieu TAP_{NH_4} . L'expression en présence de nitrate est par ailleurs presque deux fois plus importante pour le mutant *nia1* que pour un clone sauvage *nia1*⁺ isolé au cours du même croisement. Enfin, l'effet de l'azoture sur le mutant est particulièrement faible, tandis que le clone *nia1*⁺ présente la stimulation habituelle.

Ces résultats ont été confirmés au cours d'expériences d'une durée de 24 h, ainsi que par co-transformation directe d'un mutant *nia1* (souche 388) avec la construction *Aox1/Ars*.

L'ensemble de ces observations démontre que quel que soit le mode d'inactivation de l'enzyme, l'absence d'activité nitrate réductase conduit à l'augmentation de la stimulation de l'expression de la construction chimérique causée par le nitrate.

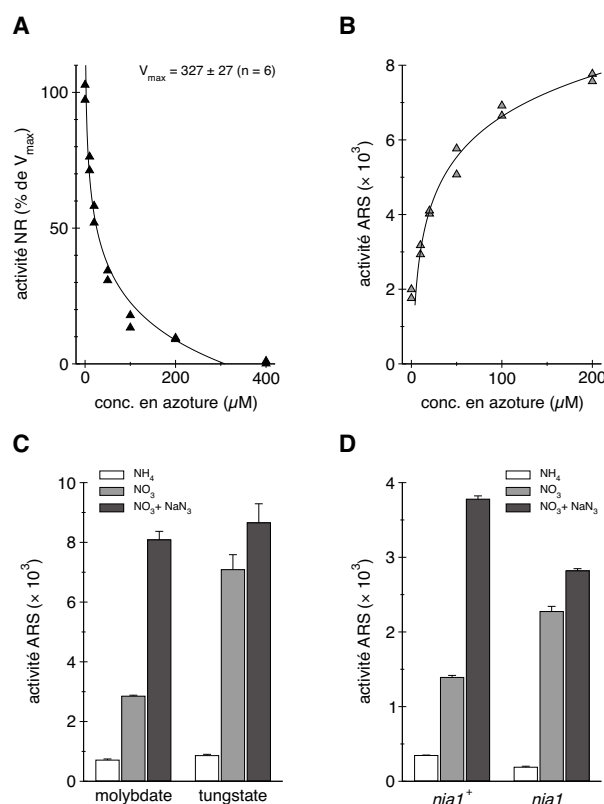


FIG. 5.9. Expression de la construction chimérique *Aox1/Ars* en relation avec l'inactivation de la nitrate réductase. **A**. Activité NR d'un extrait de la souche sauvage (83) en présence de concentrations croissantes d'azoture de sodium, exprimée en % de l'activité non inhibée (V_{\max} , $\text{nmol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$; $I_{50} = 25,7 \mu\text{M}$). Chaque symbole correspond à l'activité déterminée dans une expérience indépendante. **B**. Activité ARS ($\text{nmol naph h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) du clone 6 cultivé pendant 16 h en milieu TAP_{NO_3} liquide contenant des concentrations croissantes d'azoture de sodium. Chaque symbole correspond à l'activité déterminée dans une expérience indépendante. **C**. Activités ARS moyennes ($\text{nmol naph h}^{-1} \text{mg prot}^{-1} \pm \text{erreur-type}$) du clone 6 cultivé pendant 16 h en milieu TAP_{NH_4} , TAP_{NO_3} ou $\text{TAP}_{\text{NO}_3} + \text{NaN}_3$ liquide additionné d'1 μM de molybdate ou de tungstate ($n = 6$). **D**. Activités ARS moyennes ($\text{nmol naph h}^{-1} \text{mg prot}^{-1} \pm \text{erreur-type}$) de descendants *nia1*⁺ et *nia1* cultivés pendant 8 h en milieu TAP_{NH_4} , TAP_{NO_3} ou $\text{TAP}_{\text{NO}_3} + \text{NaN}_3$ ($n = 3$).

Nos résultats suggèrent en outre l'existence d'un effet résiduel de l'azoture de sodium, médié par l'inhibition d'un autre système enzymatique (visible sur ammonium ou bien sur nitrate, en présence de tungstate ou dans un contexte *nia1*).

5.5 Étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Aox2*

À titre de comparaison, nous avons également examiné la régulation transcriptionnelle du gène *Aox2*. Ces travaux ont été réalisés avec la collaboration de N. Coosemans et M. Dinant.

La région promotrice du gène *Aox2* a été extraite par restriction du phage λEMBL3 qui avait permis l'isolement de la séquence codante. Le fragment *Nco* I-*Nco* I de 1275 pb correspondant a été cloné au site *Sma* I du vecteur pBluescript II KS+ (Figure 5.10-A ; p. 47) et sa séquence déterminée sur les deux brins (Figure 5.11).

À l'inverse du gène *Aox1*, la position exacte de l'origine de transcription du gène *Aox2* n'a pu être déterminée par *primer extension* en raison de son niveau d'expression très faible (voir Introduction, chapitre 3, section 3.3.2 ; voir aussi Dinant et al. 2001).

```

1  CATGGCCGCCGGCGCGCGGGGCGGGCTGAGAGCCTGA 40
41  ACGGCGCTAGCAGGGCGTGGGGCTGAGGGTGACGCTGTTG 80
81  ATTGGCGGCGAGTGACGTGACTAGTTTGTAGCTGCGGGT 120
121 TAGCACGGACTGTGCACCCACCCACCGGCCACGTCGGG 160
161 ATTTGCGGGGATGCCAAAGGCCCCCAACATAGAGGCGTGT 200
201 GCTTAGTAGGCGCGCGCTCAAGGTGGCTGGGTTGATAAT 240
241 GACCCGGGATCAGCCCTTTTCTGCCATAAGGCAGCCACC 280
281 TTCTTGTTTAGCACGTCGATAACATGGCCGGCCTCAGACA 320
321 TCAAGCCGTGAGCGGTGTCTCAGCACAGCGTGACAGATGTCG 360
361 TACACTTATGAGCGCGCAGAGCGTTTCCCTCCGCTTCCC 400
401 TCCGTGTTGTGCGATTCTCTCGGCCCGCAGCAGCAGAG 440
441 CGGTGCGTGTCAAACAGTCAAATGCGCTTTGGGAACCTCC 480
481 GACGCCCTCTTACACGTGACGAGGCTAAAACGCGCCTG 520
521 CTGCATGTTAGCCCTTATGTTGAAAATGAGAAAGAGAAGA 560
561 ACAATAAAGAAACAGCGCGCGCCCAAAAGGTGACGCGG 600
601 GGTGACGAAGCGCCACCGGTGTGCTGCGTGGGTGGT TTT 640
641 GGTCCCTCAACCCGAGCGCACCCGCCCTGGCTCGGGTGC 680
681 GGCATGCGATGCCAAGTCTTATTACATTTGATATGCTCA 720
721 AAATGTTTTTGGAGATACAGTTGCAGGTTTGTAAAGGATAG 760
761 CGTAAACGCTTAAGGAGCGGAATGGATTGTCGGTGTGTC 800
801 GGAACACGCGAGTTTCTTTTGGCAAACCTTGGTGACTGTC 840
841 ATTCAGCAACTCACCGCTACCTCTATATTTTCGCTTTCTGG 880
881 TGACCCGCGTGTGTTACCGGCGCTGTACCGACCTGTTAC 920
921 GTTATGGCGCAGACGCGGTAAACGCGCCACGCATTTGTGGG 960
961 GCGACCGTTGTCGCCCCGCCATGCCCGGTGTATAAGAAGCA 1000
1001 AGACACGTACCCGCGACACGATGTTTTCTGCTGCTTTATAATA 1040
1041 GCGTCGAGTCGAAACTTCCATTGCGCTGCTCCTGCTGTCG 1080
1081 TTGCTCGCTAGCTGTTGTCCCGCGCATCGACAGATGAC 1120
1121 ATCACTCCAGCTTTGGTCCCTTTTCGCTGCACTCCAGCT 1160
1161 TTGGTCCCTTTTCGCGGCACTCGCGAGTACAGGACGGCTGC 1200
1201 TGGGACGATGTGAGGCTTGTGTGCGGGGCTCAGCGTCG 1240
1241 CCTGCCCGCTCACACAGCCTTCGCGCGCAGCCATG 1275

```

FIG. 5.11. Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène *Aox2*. La TATA box (TATAATA) et le codon initiateur (ATG) sont en caractères gras, tandis que les deux sites *Nhe*I (GCTAGC) et le site *Kpn*I (GGTACC) sont montrés sur fond gris. La numérotation des nucléotides est reprise de la séquence AF537324 de GenBank.

Deux sites *Nhe*I, dont un localisé 51 pb en aval de la TATA box et 25 pb en amont de l'ATG, ont néanmoins été choisis pour exciser un segment de 1045 pb correspondant à la région promotrice du gène *Aox2* (Figures 5.10-B, p*Aox2* et 5.11). Après purification sur gel et obtention d'extrémités franches, ce fragment a été cloné au site *Sal*I du pJD54 (Figure 5.10-B, pJD54) et les bactéries recombinantes criblées par amplification de la zone de jonction *Aox2*-*Ars* (Figure 5.10-C ; voir aussi Annexe B.2.2).

À l'instar des variantes délétées en 5' et 3' de la construction *Aox1*/*Ars* (voir chapitre 6, section 6.2), la construction chimérique *Aox2*/*Ars* n'était pas linéarisable avant transformation pour cause de site *Kpn*I naturellement présent au sein du promoteur *Aox2* (Figure 5.11). Elle a donc été introduite dans *C. reinhardtii* sous forme circulaire par co-transformation avec le plasmide pASL. Une version circulaire du plasmide pJD54 a été utilisée comme témoin négatif.

Après sélection des colonies prototrophes sur milieu TAP gélosé dépourvu d'arginine, 250 transformants choisis au hasard ont été transférés sur milieu frais, puis soumis après trois jours de culture à une détection *in situ* de l'activité ARS. Parmi ces clones, un seul (clone 1) présentait une activité clairement détectable après 1 h de coloration, tandis que treize autres transformants se coloraient très modestement endéans les 6 h. À côté de ces clones (très) faiblement positifs, aucune des 100 colonies *arg*⁺ obtenues avec le plasmide pJD54 ne produisait l'enzyme rapporteuse (données non montrées).

Sur le plan moléculaire, l'amplification de la zone de jonction *Aox2*-*Ars* (Figure 5.10-C) a démontré la présence de la construction chimérique chez dix (dont le clone 1) des quatorze clones positifs (données non montrées).

L'expression du clone 1 a dès lors été étudiée lors de tests en gouttes sur milieu TAP_{NH4} gélosé additionné de divers agents de stress, inhibiteurs et métabolites susceptibles de stimuler la voie alternative. Après 3 jours de culture, l'activité ARS a été évaluée par détection *in situ*. Comme le montre le Tableau 5.5, la coloration est faible et n'est affectée par aucun des traitements. Par ailleurs, et pour une raison inconnue, aucune coloration n'a été obtenue sur milieu TAP_{NO3} gélosé.

Ces résultats suggèrent par conséquent que le promoteur *Aox2* n'est pas en mesure de promouvoir une expression efficace du gène rapporteur *Ars*. Étant donné le très faible taux de co-expression observé (1 clone légèrement positif sur 250), il n'est pas

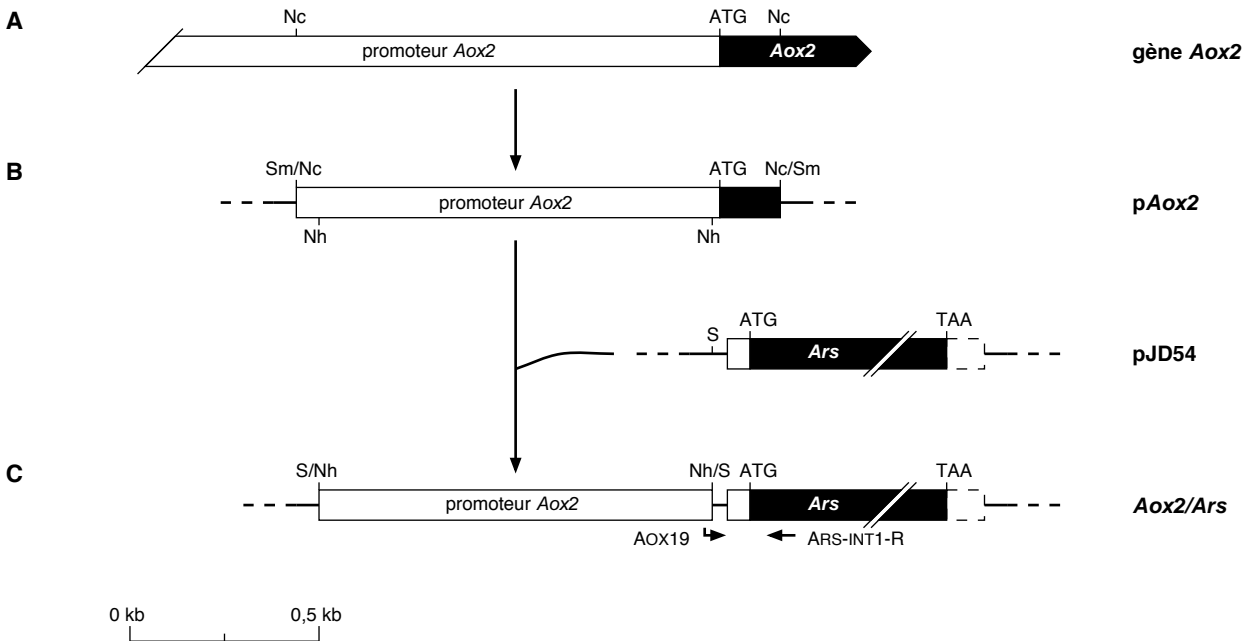


FIG. 5.10. **Stratégie de construction du plasmide *Aox2/Ars*.** Nc : site *Nco*I ; Nh : site *Nhe*I ; S : site *Sal*I ; Nc/Sm : jonction *Nco*I-*Sma*I ; Nh/S : jonction *Nhe*I-*Sal*I ; S/Nh : jonction *Sal*I-*Nhe*I ; Sm/Nc : jonction *Sma*I-*Nco*I. **A.** Représentation schématique du gène *Aox2*. **B.** Représentation schématique du promoteur *Aox2* et du plasmide pJD54, porteur du gène *Ars* dépourvu de promoteur. **C.** Représentation schématique de la construction *Aox2/Ars* montrant la position des amorces AOX19 et AOX1-INT1-R utilisées pour l'amplification et le séquençage de la zone de jonction *Aox2-Ars*.

exclu de penser que le clone 1 soit en fait un transformant chez lequel le gène *Ars* s'est mis, suite au hasard de l'insertion, sous le contrôle d'un promoteur autre qu'*Aox2*.

TAB. 5.5. **Expression du clone 1 cultivé pendant 3 jours sur milieu TAP_{NH4} gélosé additionné de divers agents de stress, inhibiteurs et métabolites susceptibles de stimuler la voie alternative.** Durée de la coloration : 1 h ; intensité du signal : faible (+).

agent, inhibiteur, métabolite	conc.	expression
aucun		+
stress oxydant		
▷ peroxyde d'hydrogène	1 mM	+
métaux lourds		
▷ cuivre	100 µM	+
inhibiteurs respiratoires		
▷ antimycine A	2 µM	+
métabolites		
▷ acide salicylique	1 mM	+
▷ acide citrique	5 mM	+

5.6 Étude de l'expression de l'AOX endogène

5.6.1 Immunodétection de l'AOX

Ayant montré que la construction *Aox1/Ars* est transcriptionnellement réprimée par l'ammonium et stimulée par le nitrate, il était intéressant d'examiner l'abondance de la protéine AOX dans une souche de type sauvage cultivée dans les mêmes conditions. Ces travaux ont été réalisés avec la collaboration de N. Coosemans et M. Dinant.

Un anticorps polyclonal dirigé contre l'AOX de *C. reinhardtii* a été utilisé à cet effet. Testé sur *Chlamydomonas*, cet anticorps s'est révélé cent fois plus sensible que l'anticorps monoclonal dirigé contre l'AOX de *Sauromatum guttatum* (M. Dinant, communication personnelle). Il a dès lors été employé pour étudier l'abondance de l'AOX dans des fractions membranaires brutes de la souche sauvage après 16 h de culture en milieu TAP liquide dépourvu ou additionné de différentes sources d'azote à 4 mM.

Comme le montre la Figure 5.12-A, une bande d'environ 40 kDa est détectée dans toutes les

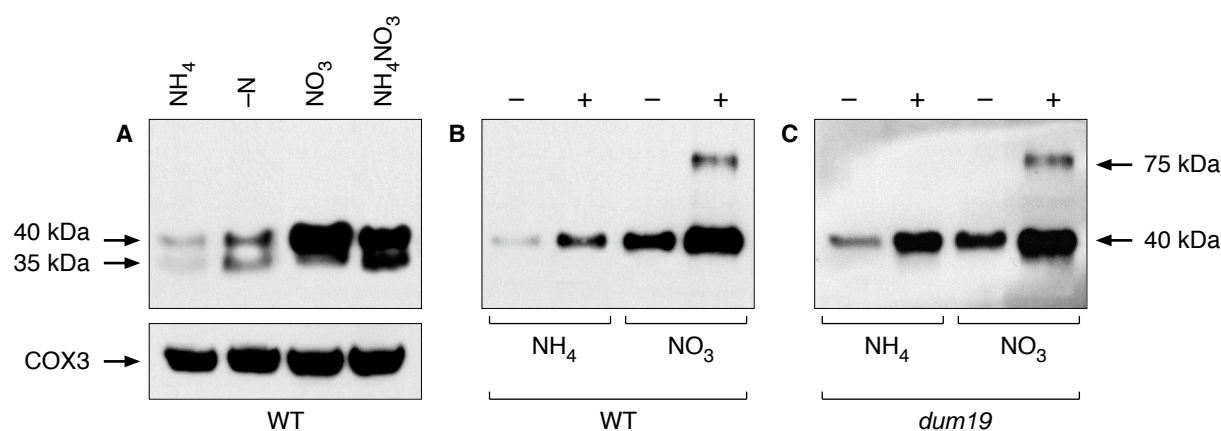


FIG. 5.12. Effets de la nature de la source d'azote et de l'azoture de sodium sur l'accumulation de l'AOX. Excepté en (A), chaque piste a été chargée avec 30 μg de protéines des fractions membranaires brutes. **A.** Immunodétection de l'AOX de la souche sauvage (83) cultivée pendant 16 h en milieu TAP_{NH_4} , TAP_{N} , TAP_{NO_3} ou $\text{TAP}_{\text{NH}_4\text{NO}_3}$ liquide. Le chargement en protéines (15 μg pour les cellules maintenues en milieu TAP_{N} , 30 μg pour les autres conditions) a été standardisé sur l'abondance de la sous-unité III de la cytochrome *c* oxydase (COX3). **B et C.** Immunodétection de l'AOX de la souche sauvage (83; B) ou d'une souche *dum19* (193) dépourvue de cytochrome *c* oxydase (C) cultivée pendant 16 h en milieu TAP_{NH_4} ou TAP_{NO_3} liquide, en absence (–) ou en présence (+) d'azoture de sodium.

conditions de culture. Cette bande correspond le plus vraisemblablement au produit du gène *Aox1* puisque le gène *Aox2* n'est que faiblement transcrit (Dinant et al. 2001 ; voir aussi section 5.5).

La masse apparente de cette protéine (40 kDa) est cependant plus élevée que celle prédite (33,4 kDa) pour l'enzyme AOX1 mature (Dinant et al. 2001). Une discordance similaire entre la masse calculée à partir de la séquence peptidique et celle déterminée en SDS-PAGE a déjà été observée dans d'autres cas, et notamment pour les différentes AOXs de soja (Finnegan et al. 1997 ; Tanudji et al. 1999).

Pour des raisons inconnues, une seconde bande d'environ 35 kDa, moins intense, est parfois détectée sur les *immunoblots* (Figure 5.12-A). Puisque les deux bandes disparaissent simultanément chez un clone antisens dépourvu de voie alternative (M. Dinant, communication personnelle), cette bande plus légère correspond vraisemblablement à une isoforme de la protéine AOX1 (peut-être un produit de dégradation). En utilisant le même anticorps, Reyes-Prieto et al. (2002) ont eux aussi détecté le polypeptide de 40 kDa, accompagné d'une bande mineure autour de 36 kDa. De plus, une situation identique a été décrite chez *Candida albicans*, où le gène *Aox1b* donne naissance à une ou deux bandes, la présence de la bande intermittente (la plus légère) étant liée aux modalités de la méthode d'extraction (Huh et Kang 2001).

Du point de vue de la régulation, la Figure 5.12-A montre que la quantité d'AOX est faible en milieu TAP_{NH_4} , plus élevée en milieu TAP_{N} et très importante en milieu TAP_{NO_3} . Par rapport à cette dernière condition, la quantité d'AOX est légèrement réduite en milieu $\text{TAP}_{\text{NH}_4\text{NO}_3}$. Dans les mêmes conditions de chargement, aucune modification de l'abondance de la sous-unité III de la cytochrome *c* oxydase n'est observée.

L'effet de 200 μM d'azoture de sodium a ensuite été examiné après culture de la souche sauvage en milieu TAP_{NH_4} ou TAP_{NO_3} liquide (Figure 5.12-B). Comme pour l'enzyme rapporteuse ARS, l'accumulation d'AOX est nettement plus élevée en présence de l'inhibiteur, l'abondance de la protéine étant particulièrement importante en milieu TAP_{NO_3} . Par ailleurs, dans ce dernier cas, une bande additionnelle de masse apparente avoisinant les 75 kDa est systématiquement détectée. Il pourrait s'agir d'une forme dimérique de l'AOX, uniquement visible dans des conditions de surexpression.

Des réponses similaires à l'azoture ont été obtenues chez un mutant *dum19* (dépourvu de cytochrome *c* oxydase ; Figure 5.12-C), confirmant une fois de plus que l'effet positif de l'azoture n'est pas lié à l'inactivation de la cytochrome *c* oxydase.

Enfin, d'autres expériences d'immunodétection réalisées en parallèle sur une même membrane indiquent que quelles que soient les conditions de

culture, les quantités d'AOX sont du même ordre de grandeur chez la souche sauvage et chez le mutant *dum19* (données non montrées).

5.6.2 Étude de l'activité respiratoire

En vue d'étudier l'impact de la quantité d'enzyme AOX sur la capacité des deux voies de respiration, des cellules de type sauvage ont été cultivées pendant 16 h en milieu TAP_{NH_4} ou TAP_{NO_3} liquide. La capacité de la voie alternative et celle de la voie des cytochromes ont ensuite été déterminées par addition de cyanure suivi de n-propyl gallate, ou en procédant dans l'ordre inverse (*voir* Matériel et Méthodes, chapitre 9, section 9.3.9).

Comme le montre le Tableau 5.6, la respiration totale n'est nullement affectée par la nature de la source d'azote. En revanche, la capacité de la voie alternative est plus de deux fois plus élevée en milieu TAP_{NO_3} qu'en milieu TAP_{NH_4} (15,0 *vs* 6,5 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} 10^{-7} \text{ cell}$). De son côté, la capacité de la voie des cytochromes n'est guère modifiée par la présence de nitrate (21,5 *vs* 15,7).

TAB. 5.6. **Activités respiratoires moyennes de cellules de la souche sauvage (83) cultivées pendant 16 h en milieu TAP_{NH_4} ou TAP_{NO_3} liquide.** La respiration est exprimée en $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} 10^{-7} \text{ cell} \pm \text{erreur-type}$. Les additions d'inhibiteurs (1 mM final) ont été effectuées dans l'ordre indiqué ($n = 3$ à 6).

	TAP_{NH_4}	TAP_{NO_3}
Totale	$28,7 \pm 0,3$	$28,6 \pm 0,5$
+ KCN	$6,8 \pm 0,3$	$15,7 \pm 1,5$
+ PG	$0,3 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,3$
Totale	$27,1 \pm 0,9$	$30,0 \pm 1,1$
+ PG	$15,7 \pm 1,2$	$21,8 \pm 2,0$
+ KCN	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,2$

L'ensemble des résultats de ce chapitre montre qu'il existe une bonne corrélation entre l'expression transcriptionnelle de la construction chimérique *Aox1/Ars*, l'accumulation de la protéine AOX et la capacité de la voie alternative. En outre, le nitrate joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression du gène *Aox1*.

Par ailleurs, les observations enregistrées avec la construction *Aox2/Ars* confirment que l'activité transcriptionnelle du gène *Aox2* est très faible par rapport à son homologue *Aox1*.

Chapitre 6

Analyse de la structure du promoteur *Aox1*

Après avoir examiné les facteurs modulant la transcription du gène *Aox1* et montré que son expression était principalement sous le contrôle de la nature de la source d'azote, nous avons envisagé de rechercher les régions du promoteur responsables de cette régulation.

6.1 Identification d'un promoteur *Aox1* minimal

En vue d'identifier un promoteur minimal encore capable d'assurer l'expression et la régulation transcriptionnelle du gène *Aox1*, six fragments du promoteur délété en 5' ont été produits par PCR et fusionnés au gène rapporteur *Ars*.

Dénommées *Aox1*Δ1/*Ars*, *Aox1*Δ2/*Ars*, *Aox1*Δ3/*Ars*, *Aox1*Δ4/*Ars*, *Aox1*Δ5/*Ars* et *Aox1*Δ6/*Ars*, ces constructions contiennent des portions de la région amont du gène *Aox1* s'étendant respectivement de la base +59 aux positions -1129, -935, -694, -466, -253 et -59 (par rapport à l'origine de transcription du gène *Aox1*). Elles doivent toutes générer des transcrits débutant par une 5'-UTR de 159 nt de long, dont 59 nt (au lieu de 60 nt pour *Aox1*/*Ars*) issus du gène *Aox1* et 69 nt originaires du gène *Ars* (Figure 6.1 ; voir aussi Annexes B.3.1 à B.3.6).

6.1.1 Construction des plasmides *Aox1*Δ1/*Ars* à *Aox1*Δ6/*Ars*

Les régions d'intérêt ont été amplifiées à l'aide d'amorces introduisant des sites de restriction qui faciliteront le clonage des produits PCR en amont du gène rapporteur.

Alors que le plasmide pJD54 (porteur du gène *Ars* dépourvu de promoteur) dispose d'un site unique *Sal*I permettant l'insertion d'un promoteur hétérologue (voir chapitre 5, section 5.1.2), ce sont des sites *Xho*I qui ont été introduits de part et d'autre des fragments amplifiés. Le choix de cette enzyme compatible avec *Sal*I se justifiait par la présence, au sein même du promoteur *Aox1*, de deux sites *Sal*I qui auraient compromis l'intégrité des produits PCR au cours de l'étape de digestion (Figure 6.2).

En amont du site *Xho*I, chaque oligonucléotide commençait par quatre bases de rembourrage destinées à assurer une bonne assise à l'enzyme et une restriction efficace (Zimmermann et al. 1998). Dans le but d'optimiser l'amplification par PCR, toutes ces amorces ont été positionnées autour de sites de restriction imparfaits auxquels il suffisait de substituer un maximum de deux nucléotides pour obtenir un site *Xho*I fonctionnel.

La séquence nucléotidique du promoteur *Aox1*, ainsi que les positions des six oligonucléotides sens (XHOI-235-F, XHOI-429-F, XHOI-670-F, XHOI-898-F, XHOI-1111-F et XHOI-1305-F), de l'amorce antisens commune à toutes les constructions (XHOI-1423-R) et des sites *Xho*I imparfaits sont présentées à la Figure 6.2.

Après amplification, les six produits de 1202, 1008, 767, 539, 326 et 132 pb ont été digérés par *Xho*I, insérés au site *Sal*I du pJD54 préalablement déphosphorylé et les mélanges de ligation introduits par transformation dans la souche DH5α d'*Escherichia coli*. Pour chaque transformation, 24 à 48 colonies ont été criblées par amplification de la zone de jonction *Aox1*-*Ars* et un à sept clones positifs ont été identifiés. Certains d'entre eux ont également été contrôlés par double digestion *Kpn*I-*Sal*I

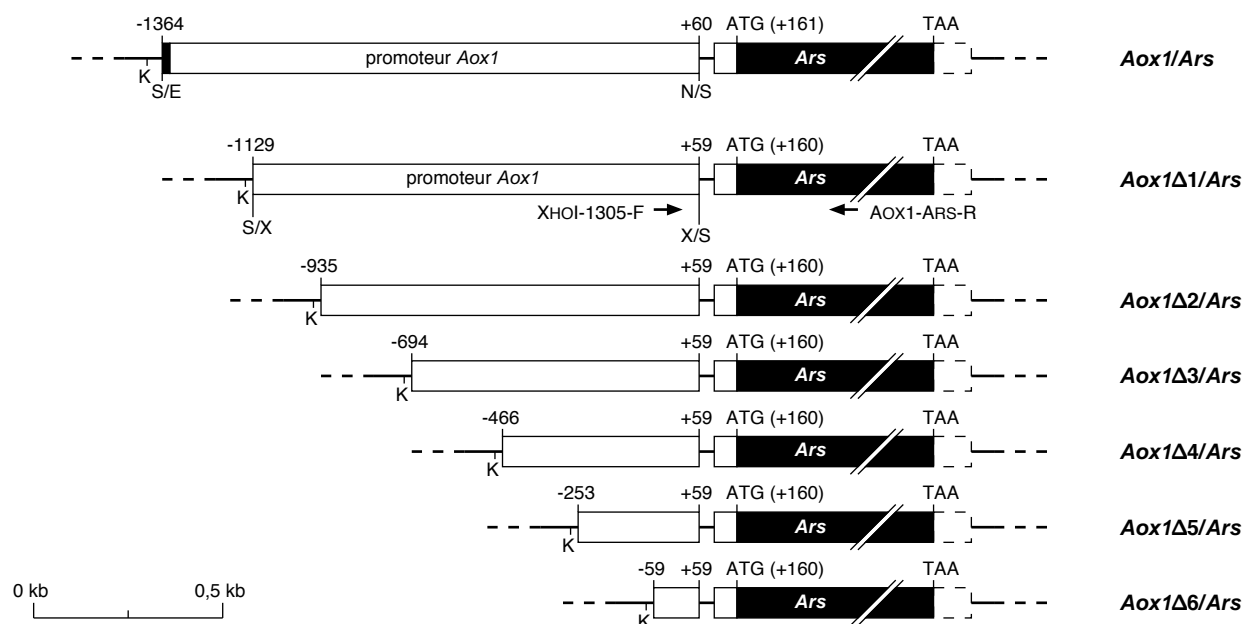


FIG. 6.1. Représentation schématique des constructions chimériques *Aox1Δ1/Ars* à *Aox1Δ6/Ars* comparativement à la construction originale *Aox1/Ars*. La numérotation est relative à l'origine de transcription du gène *Aox1* (+1 ; Dinant et al. 2001). Les amorces XHOI-1305-F et AOX1-ARS-R utilisées pour l'amplification et le séquençage de la zone de jonction *Aox1-Ars* sont symbolisées par des flèches. K: site *Kpn*I; N/S: jonction *Nru*I-*Sal*I; S/E: jonction *Sal*I-*Eco*RI; S/X: jonction *Sal*I-*Xho*I; X/S: jonction *Xho*I-*Sal*I.

(*Aox1Δ1/Ars* à *Aox1Δ5/Ars*) ou par simple restriction avec l'enzyme *Hinf*I (*Aox1Δ6/Ars*).

Les zones de jonction *Aox1-Ars* de six plasmides candidats ont ensuite été séquencées afin de vérifier leur conformité au modèle. Hormis l'insertion de deux à quatre bases supplémentaires dans les constructions *Aox1Δ2/Ars* et *Aox1Δ3/Ars*, les quatre autres plasmides présentaient les jonctions attendues (voir Annexes B.3.1 à B.3.6). Sans doute liées à l'utilisation d'un protocole simplifié pour la réaction de ligation de ces constructions (absence d'étapes de purification et de déphosphorylation), ces insertions mineures ne devaient en rien influencer l'expression du gène rapporteur *Ars*.

6.1.2 Transformation de *C. reinhardtii* et expression des constructions

Après linéarisation par *Kpn*I, ces six nouvelles constructions ont été introduites comme précédemment dans la souche 325 de *C. reinhardtii* par co-transformation avec le plasmide pASL. Les colonies indépendantes de l'arginine ont été sélectionnées sur milieu TAP gélosé.

Dans un premier temps, 25 clones *arg*⁺ issus de chaque transformation ont été choisis au hasard et colorés *in situ* en vue de déterminer le pourcentage de transformants exprimant l'ARS. Avec les constructions *Aox1Δ1/Ars* à *Aox1Δ5/Ars*, le taux de clones *ars*⁺ était élevé (co-expression de 56 à 80 %), tandis qu'il chutait à 8 % avec *Aox1Δ6/Ars* (Tableau 6.1). Cela indique que le segment compris entre -253 et +59 (*Aox1Δ5/Ars*) du promoteur *Aox1* contient des éléments nécessaires à l'expression du gène rapporteur *Ars*.

Par ailleurs, pour les constructions *Aox1Δ1/Ars*, *Aox1Δ3/Ars* et *Aox1Δ6/Ars*, l'ADN total des 25 clones *arg*⁺ a été utilisé pour amplifier la jonction *Aox1-Ars*, afin de déterminer le pourcentage de cellules co-transformées. Les taux obtenus (de 79 à 87 % ; Tableau 6.1) étaient suffisamment élevés et homogènes pour examiner les activités ARS de pools de transformants *arg*⁺.

Les niveaux d'expression de l'ARS sont en effet très différents parmi les clones obtenus au cours d'une co-transformation donnée (voir chapitre 5, Figure 5.2). Cette variabilité est liée tant au caractère aléatoire de l'intégration des plasmides dans le génome qu'à l'influence du voisinage du site d'insertion.

```

1  AAGTAGTCGACGCGCTGTAGACATCTCTGCGCGTCTCGCTA 40
41 CAAGTGCAAGCTTCGTAGGCGTGAGGCGGGCGCGTTCAA 80
81 CTAGTCCGATCGACTGCTGGCAACACAAGTTGTGATTGAT 120
121 GGTGCAGTTGGCGTGTCTGATGCGCGTGCACAAACGTCCTCAA 160
161 CGAGTGTGTGCGCTTGCTACGCGCTGTATGACCAGAAGAC 200
201 TAACTCTGGACGCTGCGGACCGATATATGTTAGACGAC 240
      XhoI-235-F >
241 GTGCACGGAAGCGCAGAACCGCGCTTGTCCAGTGT 280
281 CGTATACTGGAAAACGTCCATGTGGCTGCCCGCGTGGCAA 320
321 CTGACTTCGGTGTCTTCTTGTATTAAGTTCTGTGGTGT 360
361 ATCAAAAGCTGTGTTGTCACCGTAGGGCGAGCGCGCGAC 400
401 GGGATACTTCGGTGTGACCCAGAAACCTACAGCGCGCTG 440
      XhoI-429-F >
441 CCAGAATGACATCTGAACCTTTTGAAGAGAAATTGTGC 480
481 TTGTAGTTTGTTCGAGCTATTATCGTGGCGTGGCAGCA 520
521 TGGCGGTTGGCGTGGCGGTTGGGTCCGCGTGGGAAGTCCG 560
561 TTCACCAAAAGTGAGCCGAGAGGCTTACGACTACACACA 600
601 CGAATATGAAGTGCAAAATGAAGGGTCGTGGGTACTTAC 640
641 GGGTTCCTTGAGATTGTCAAGTGTGTTGGTTCGAGGTTT 680
      XhoI-670-F >
681 CCGCATCCCCCTTCATACAGTAGCTTCCCGCTCCTTGCCA 720
721 TGACTATGCTGTGATGACAGTTAGGTAGTTGACATTCATAC 760
761 GTACCGTGTGCGAGGAGCGCGCACCGCCCTTGTGCACGT 800
801 ACGTCCCCAAGATGCAAGATGCAACTGTGGGCGAGGGAG 840
841 GGGTTCCTAGCACGGAAGAACGCGCCCAATTAATGAGCC 880
881 ACCAGAGCTGCGGTGTCGTCGAGATGACAGCGACCTAGGT 920
      XhoI-898-F >
921 ACATAGGCCATCAGCGGAAGCGGATCGCATGCCTCAGCG 960
961 CAAGGCTCAAGACATGGCTGAGTAAGTAAGGCGGTTGAG 1000
1001 TGCTCTATGCCCTCTGCGCTTTGATCCCCGCGACGTCCCC 1040
1041 GCACACGCAATGAGCAGTTGCGTCATCAAGCCTCCC 1080
1081 AGGCGGCGCTCGGCATCCAGGGGCTCGGCCTCGACGTGC 1120
      XhoI-1111-F >
1121 AACCCGATGCGCGCTGCGAGCGGTTGGCCACCGTGCTTC 1160
1161 TGTGCTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCT 1200
1201 GTAGATTACACGTTGCGGCGGCGGTCGACACCAAGTGCAT 1240
1241 CACGAACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAGTGCCTTCCG 1280
1281 GTGCATGCAACATGTGAGCGCTGCTCGAATCGTCTACAC 1320
      XhoI-1305-F >
1321 TGGAACTTGAAACGCTATATTACTGTTCCCTTACTATAAC 1360
1361 GCGGTAAATCTCTCTCGCACTCACTTACCAAGAACTCA 1400
1401 ACCTTACGTCACCGTTTCGATATCGCGATGCTTCAGACCGC 1440
      < XhoI-1423-R
1441 ACCTATGCTTCCGGGCTTGGGCCACACCTCGTCCCGCAA 1480
1481 TTGGGAGCCCTGGCCAGCGCTTCTCGTCTTCTGGGCTCCA 1520
1521 TA 1522

```

FIG. 6.2. Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène *Aox1*. Les six amorces sens (>) et l'amorce antisens (<) sont soulignées, tandis que les deux sites *SalI* (GTCGAC) et les sept sites *XhoI* (CTCGAG) imparfaits (à un ou deux nucléotides près) retenus sont montrés sur fond gris. La TATA box (TATATTA), l'origine de transcription (T^{1365}) et le codon initiateur (ATG) du gène *Aox1* sont en caractères gras, alors que le début des séquences codantes *Nrt2;3* (en haut) et *Aox1* (en bas) est représenté en gris. La numérotation des nucléotides est reprise de la séquence AF537323 de GenBank.

tion sur la transcription des constructions (effets de position ; revue par Kindle 1998).

Une solution élégante à ce problème a néanmoins été mise au point par Ohresser et al. (1997). Il s'agit de récolter quelques centaines de colonies *arg*⁺ issues d'une même expérience de co-transformation et de les considérer comme une seule population (un *pool*) sans sélection préalable des transformants

porteurs de la construction chimérique. Ce procédé contourne les effets de position et dispense de caractériser moléculairement les événements d'intégration dans des dizaines de transformants individuels. Néanmoins, comme certains transformants *arg*⁺ n'ont pas intégré de construction chimérique (ou l'expriment peu), les activités ARS de ces *pools* sont généralement plus faibles que celles observées dans des clones isolés d'activité élevée (Ohresser et al. 1997 ; Loppes et Radoux 2001).

Environ 300 colonies *arg*⁺ issues de chaque transformation ont donc été récoltées en *pools* et réévaluées sur milieu TAP_{NH4} gélosé frais. Après trois jours, ces cellules ont été transférées et cultivées pendant 16 h en milieu TAP liquide contenant soit de l'ammonium, soit du nitrate, soit du nitrate additionné d'azote de sodium. Les activités ARS ont ensuite été déterminées comme précédemment. Les résultats présentés à la Figure 6.3 proviennent de deux séries indépendantes de co-transformations, où chaque échantillon a été examiné en dupliquat.

En dehors de la construction *Aox1Δ6/Ars*, qui ne donne lieu qu'à des activités ARS très faibles et non significativement différentes de celles d'un *pool* porteur du plasmide pJD54 (gène *Ars* dépourvu de promoteur), l'expression de l'ARS a pu être analysée avec toutes les constructions.

La tendance générale en milieux TAP_{NO3} et TAP_{NO3} + NaN₃ est une diminution de l'expression en passant des plasmides *Aox1Δ1/Ars* à *Aox1Δ5/Ars*. Toutefois, les activités ARS de ces cinq constructions restent plus élevées en milieu TAP_{NO3} qu'en milieu TAP_{NH4} et montrent toujours l'effet stimulateur de l'azote.

Ces résultats indiquent donc que des éléments nécessaires à la transcription et à la régulation du gène

TAB. 6.1. Taux de transformants *arg*⁺ exprimant l'ARS (co-expression) et de cellules co-transformées déterminés sur des échantillons de 25 clones obtenus avec les constructions *Aox1Δ1/Ars* à *Aox1Δ6/Ars*.

construction	transf. <i>arg</i> ⁺ exprimant l'ARS	cellules co-transf.
<i>Aox1Δ1/Ars</i>	56 %	79 %
<i>Aox1Δ2/Ars</i>	68 %	n.d.
<i>Aox1Δ3/Ars</i>	68 %	79 %
<i>Aox1Δ4/Ars</i>	60 %	n.d.
<i>Aox1Δ5/Ars</i>	80 %	n.d.
<i>Aox1Δ6/Ars</i>	8 %	87 %

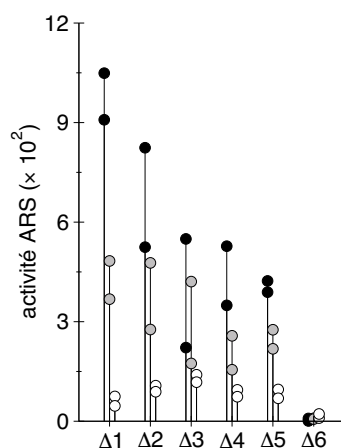


FIG. 6.3. Activités ARS de *pools* de transformants *arg*⁺ obtenus avec les constructions *Aox1Δ1/Ars* à *Aox1Δ6/Ars* (Δ1 à Δ6) et cultivés pendant 16 h en milieu TAP_{NH4} (cercles blancs), TAP_{NO3} (cercles gris) ou TAP_{NO3} + NaN₃ (cercles noirs) liquide (4 mM; NaN₃ 200 μM). Chaque symbole correspond à l'activité moyenne (nmol naph h⁻¹ mg prot⁻¹) de deux mesures effectuées dans chaque expérience de co-transformation.

Ars sont présents dans le court segment (de -253 à -59) qui distingue *Aox1Δ5/Ars* de *Aox1Δ6/Ars*, mais que des éléments distaux sont également requis pour une expression maximale.

6.2 Dissection de la région 3' du promoteur *Aox1*

En vue de confirmer que des éléments critiques se trouvent dans la région -253 à -59 du promoteur *Aox1*, de nouvelles délétions ont été effectuées. Trois variantes du fragment *Aox1Δ5/Ars* délétées en 3' ont été clonées dans le pJD100. Ce plasmide porte le gène rapporteur *Ars* sous le contrôle d'un promoteur minimal dérivé du gène *TubB2* (encodant une β-tubuline d'expression constitutive) de *C. reinhardtii* et cloné au site *Sal*I du pJD54 (Davies et al. 1992; Davies et Grossman 1994).

Dénommées *Aox1Δ51/Ars*, *Aox1Δ52/Ars* et *Aox1Δ53/Ars*, ces constructions contiennent des portions de la région amont du gène *Aox1* s'étendant respectivement de la base -267 aux positions -39, -133 et -187 (relativement à l'origine de transcription du gène *Aox1*; Figure 6.4; p. 54; voir aussi Annexes B.4.1 à B.4.3). Elles génèrent des transcrits débutant par une 5'-UTR de 170 nt de long, dont 65 nt issus du gène *TubB2* et 69 nt originaires du gène *Ars*.

En raison de l'indisponibilité du site *Sal*I dans le pJD100, ce sont des sites *Kpn*I qui ont été introduits de part et d'autre des fragments amplifiés. Hormis cela, les plasmides *Aox1Δ51/Ars* à *Aox1Δ53/Ars* sont très similaires aux constructions précédentes.

L'extrémité 3' de la séquence du promoteur *Aox1*, ainsi que les positions de l'oligonucléotide sens commun à toutes les constructions (KPN1-1097-F), des trois amorces antisens (KPN1-1326-R, KPN1-1232-R et KPN1-1178-R) et des sites *Kpn*I imparfaits sont présentées à la Figure 6.5.

Une fois amplifiés, les trois produits de 243, 149 et 95 pb ont été digérés par *Kpn*I, insérés au site correspondant du pJD100 préalablement déphosphorylé et les mélanges de ligation introduits par transformation dans la souche DH5α d'*Escherichia coli*. Des clones conformes aux constructions *Aox1Δ51/Ars*, *Aox1Δ52/Ars* et *Aox1Δ53/Ars* ont été isolés après restriction (*Ava*II et *Hinf*I) et séquençage des zones de jonction (voir Annexes B.4.1 à B.4.3).

Puisque ces nouvelles constructions ne pouvaient être linéarisées par *Kpn*I (ou toute autre endonucléase courante), elles ont été introduites dans *C. reinhardtii* sous forme circulaire par co-transformation avec le plasmide pASL. Des versions circulaires des constructions *Aox1/Ars* et *Aox1Δ5/Ars* ont été utilisées comme témoins.

1001	TGCTCTATGCCCTCTGCGCTTTGATCCCCGCGACGTCCCC	1040
1041	GCACACGACGAATTGAGCAGTTCGGTCATCAAGCCTCCC	1080
1081	AGGCGGCCGCTCGGCATCCAGGGGCTCGGCCTCGACGTGC	1120
	KPN1-1097-F >	
1121	AACCCGATGCGCCGTGCGAGCGTTGGCCACCCTGCTTC	1160
1161	TGTGCTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCT	1200
	< KPN1-1178-R	
1201	GATGATTACAACGTTGCGCGCGCTCGACACCAAGTGCAT	1240
	< KPN1-1232-R	
1241	CACGAACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAAGTGCCTTCCG	1280
1281	GTGCATGCAACATGTGAGCGCTGCTCGAATCGTCTACAC	1320
1321	TGGAACTTCGAAACGTTATATTACTGTTCTTACTATAAC	1360
	< KPN1-1326-R	
1361	GGCGTAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCAAGAAGTCA	1400
1401	ACGTTACGTCACCGTTCGATATCGCGATGCTTCAGACCGC	1440
1441	ACCTATGCTTCGGGCTTGGGCCACACCTCGTCCCGCAA	1480
1481	TTGGGAGCCCTGGCCAGCGCTTCTCGTCTTCTGGGCTCCA	1520
1521	TA	1522

FIG. 6.5. Extrémité 3' de la séquence nucléotidique de la région promotrice du gène *Aox1*. L'oligonucléotide sens (>) et les trois amorces antisens (<) sont soulignées, tandis que les quatre sites *Kpn*I imparfaits retenus (GGTACC) sont montrés sur fond gris. La TATA box (TATATTA), l'origine de transcription (T¹³⁶⁵) et le codon initiateur (ATG) du gène *Aox1* sont en caractères gras, alors que le début de sa séquence codante est représenté en gris. La numérotation des nucléotides est reprise de la séquence AF537323 de GenBank.

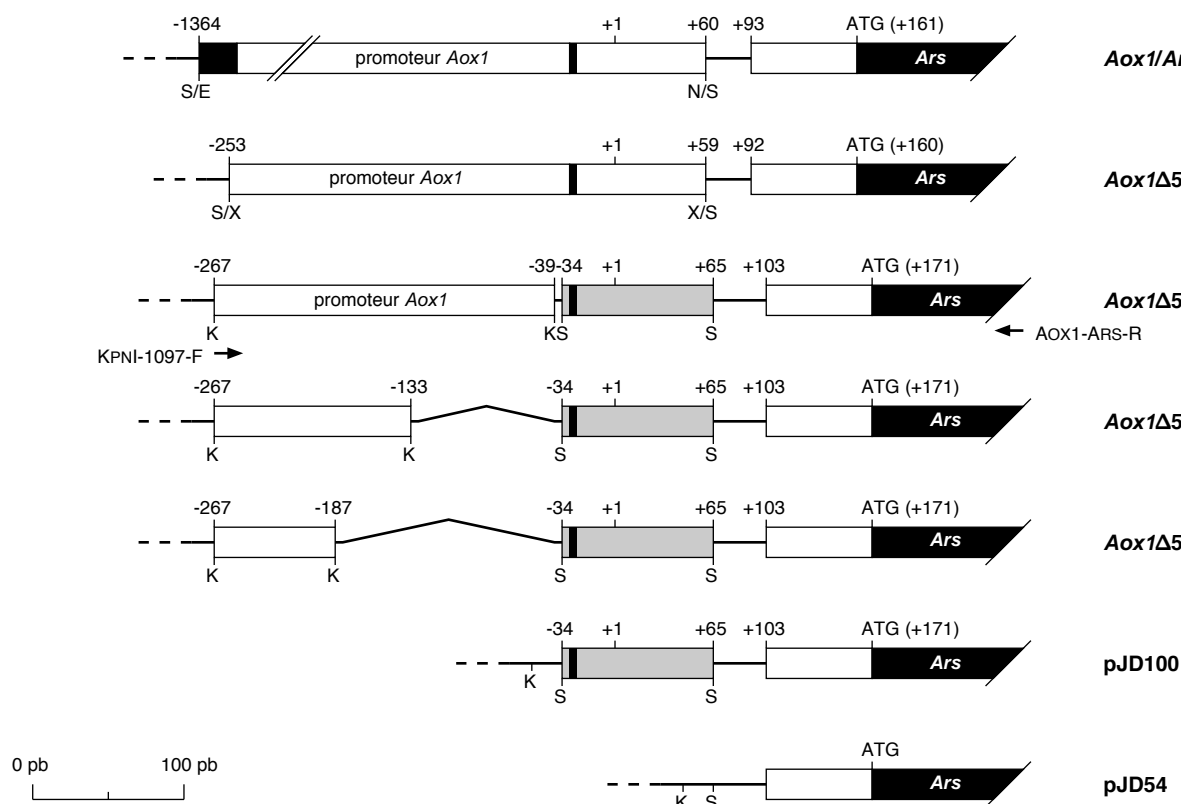


FIG. 6.4. Représentation schématique des constructions chimériques *Aox1*Δ51/*Ars* à *Aox1*Δ53/*Ars* comparativement aux constructions *Aox1*/*Ars* et *Aox1*Δ5/*Ars*, ainsi qu'aux plasmides pJD54 et pJD100. La numérotation est relative à l'origine de transcription de chaque gène (+1; Goldschmidt-Clermont et Rahire 1986; Dinant et al. 2001). Le segment comprenant le promoteur minimal *TubB2* est montré sur fond gris et la TATA box sous forme de filet vertical noir. Les amorces KPNI-1097-F et AOX1-ARS-R utilisées pour l'amplification et le séquençage de la zone de jonction *Aox1*-*Ars* sont symbolisées par des flèches (la seconde est arbitrairement positionnée). K: site *Kpn*I; S: site *Sal*I; N/S: jonction *Nru*I-*Sal*I; S/E: jonction *Sal*I-*Eco*RI; S/X: jonction *Sal*I-*Xho*I; X/S: jonction *Xho*I-*Sal*I.

Après sélection des colonies prototrophes sur milieu TAP gélosé, le pourcentage de transformants exprimant l'ARS a été déterminé comme ci-dessus. Chez les témoins, les taux de co-expression (respectivement 31 % et 27 % pour *Aox1*/*Ars* et *Aox1*Δ5/*Ars*; Tableau 6.2) étaient inférieurs à ceux relevés lors de l'expérience précédente, probablement parce que le gène rapporteur d'un plasmide circulaire est davantage sujet à l'interruption que celui d'un plasmide linéaire (Davies et Grossman 1994; Loppes et Radoux 2001). Les taux de co-expression étaient en outre particulièrement faibles avec les constructions *Aox1*Δ52/*Ars* et *Aox1*Δ53/*Ars* (4 et 8 %), suggérant que celles-ci sont incapables de promouvoir une transcription efficace du gène *Ars*.

Le taux de co-transformation pour les plasmides *Aox1*Δ5/*Ars*, *Aox1*Δ51/*Ars* et *Aox1*Δ52/*Ars* était à nouveau très homogène (de 75 à 79 %; Tableau 6.2),

nous permettant de mesurer les activités ARS dans des pools de transformants.

TAB. 6.2. Taux de transformants *arg*⁺ exprimant l'ARS et de cellules co-transformées déterminés sur des échantillons de 25 clones obtenus avec les constructions *Aox1*/*Ars*, *Aox1*Δ5/*Ars* et *Aox1*Δ51/*Ars* à *Aox1*Δ53/*Ars*.

construction	transf. <i>arg</i> ⁺ exprimant l'ARS	cellules co-transf.
<i>Aox1</i> / <i>Ars</i>	31 %	75 %
<i>Aox1</i> Δ5/ <i>Ars</i>	27 %	n.d.
<i>Aox1</i> Δ51/ <i>Ars</i>	15 %	79 %
<i>Aox1</i> Δ52/ <i>Ars</i>	8 %	79 %
<i>Aox1</i> Δ53/ <i>Ars</i>	4 %	n.d.

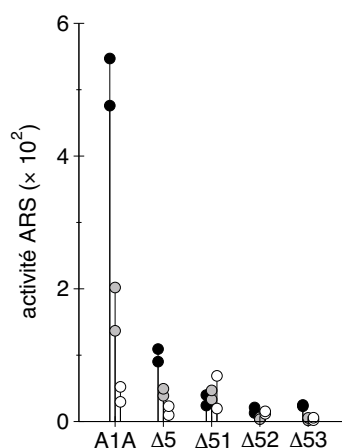


FIG. 6.6. Activités ARS de pools de transformants *arg*⁺ obtenus avec les constructions *Aox1/Ars* (A1A), *Aox1-Δ5/Ars* (Δ5) et *Aox1Δ51/Ars* à *Aox1Δ53/Ars* (Δ51 à Δ53) et cultivés pendant 16 h en milieu TAP_{NH4} (cercles blancs), TAP_{NO3} (cercles gris) ou TAP_{NO3} + NaN₃ (cercles noirs) liquide (4 mM ; NaN₃ 200 μM). Chaque symbole correspond à l'activité moyenne (nmol naph h⁻¹ mg prot⁻¹) de deux mesures effectuées dans chaque expérience de co-transformation.

Au cours de deux séries indépendantes de co-transformations, environ 200 colonies *arg*⁺ ont été regroupées dans chaque cas et réétalées sur milieu TAP_{NH4} gélosé, puis cultivées pendant 16 h en milieu TAP liquide contenant soit de l'ammonium, soit du nitrate, soit du nitrate additionné d'azoture de sodium (Figure 6.6).

Les activités ARS obtenues avec les constructions *Aox1Δ52/Ars* et *Aox1Δ53/Ars* sont négligeables et non significativement différentes de celles d'un pool porteur du plasmide pJD100 ou privé de construction. En revanche, la construction *Aox1Δ51/Ars* dépourvue du segment -39 à +59 est encore exprimée, mais ne paraît plus soumise à régulation. Comme attendu, la construction *Aox1Δ5/Ars* présente un niveau d'expression ARS inférieur à la construction *Aox1/Ars*, mais répond toujours aux stimulations par le nitrate et l'azoture.

Considérés dans leur ensemble, les résultats obtenus avec ces différentes constructions chimériques indiquent que :

1. des éléments résidant entre les positions -133 et -39 sont nécessaires pour promouvoir une transcription suffisante au gène *Aox1* ;
2. des éléments conférant au gène *Aox1* une réponse à la source d'azote et à l'azoture de sodium sont situés dans le segment -39 à +59 ;

3. des éléments de la partie distale du promoteur *Aox1* sont requis pour assurer une expression et une régulation maximales du gène *Aox1*.

6.3 Recherche et discussion d'éléments conservés dans le promoteur *Aox1*

Dans un premier temps, nous avons recherché des éléments conservés dans le promoteur *Aox1*. Une liste de 44 motifs nucléotidiques rapportés comme potentiellement impliqués dans la régulation transcriptionnelle chez *C. reinhardtii* (ou *Volvox carteri*) ont été compilés à cet effet (la liste en est fournie à la section D.1 de l'Annexe D). La soumission de ces motifs au programme findpatterns (GCG) a révélé l'existence de 18 éléments conservés dans les 1403 pb du promoteur *Aox1*, parmi lesquels 10 éléments différents (voir Annexe D, section D.2). La plupart de ces motifs sont longs de 4 à 6 nt et aucun ne correspond aux éléments de réponse à l'azote décrits pour la région promotrice du gène *Nia1* de *C. reinhardtii* (Loppes et Radoux 2001, 2002). D'autres éléments présents dans le promoteur du gène *Nia1* chez *Chlorella vulgaris* (Cannons et Shiflett 2001) sont également absents.

Deux motifs consécutifs de 6 nt ont été trouvés dans la région distale du promoteur, région probablement porteuse d'éléments de régulation et maintenue dans les constructions *Aox1/Ars* et *Aox1-Δ1/Ars* (voir sections précédentes). Ces éléments sont une GGCGAG box (-979 à -974) déjà repérée dans deux gènes inductibles par la lumière (Hahn et Kuck 1999) et un motif CGCGCC (-973 à -968) identifié dans quatre gènes soumis à la régulation par le CO₂ (Kucho et al. 1999). Ce second motif est aussi présent sur le brin complémentaire du promoteur, entre les positions -1290 et -1295. Recouvrant cet élément (-1297 à -1292), une GC-like box (CGGGCG) décrite dans les quatre gènes tubulines (Periz et Keller 1997) a par ailleurs été détectée. Avec les trois nucléotides voisins, ces deux dernières boîtes composent une GC-rich region de 11 nt pratiquement canonique (Brunke et al. 1984 ; Bandziulis et Rosenbaum 1988 ; Davies et Grossman 1994). Celle-ci est située entre les positions -1300 et -1290, c'est-à-dire à proximité du gène *Nrt2;3*.

Dans la région proximale -253 à -59, particulièrement importante pour l'expression et la régulation du gène *Aox1* (voir sections précédentes), aucun

motif remarquable n'a été identifié. En revanche, une GAATCG *box* a été localisée entre les positions -57 et -52. Également recensé dans trois gènes inductibles par la lumière (Hahn et Kuck 1999), cet élément conservé de 6 nt s'avère absent des constructions *Aox1Δ52/Ars* et *Aox1Δ53/Ars*, toutes deux incapables de promouvoir l'expression du gène rapporteur *Ars*.

Conformément à une pratique courante, nous avons dans un second temps étudié la probabilité d'apparition de chacun de ces motifs dans la région promotrice du gène *Aox1*. Connaissant la composition nucléotidique de ce fragment de 1403 nt (voir Annexe D, section D.2), nous avons d'abord calculé pour chaque nucléotide les fréquences suivantes :

$$\begin{aligned} f_A &= 304/1403 = 0,2167 \\ f_C &= 370/1403 = 0,2637 \\ f_G &= 403/1403 = 0,2872 \\ f_T &= 326/1403 = 0,2324 \end{aligned}$$

Ainsi, par exemple, dans le cas du motif GAATCG, la probabilité d'apparition est :

$$\begin{aligned} P(\text{GAATCG}) &= f_G \cdot f_A \cdot f_A \cdot f_T \cdot f_C \cdot f_G \\ &= 0,2872^2 \cdot 0,2167^2 \cdot 0,2324 \cdot 0,2637 \\ &= 2,37 \times 10^{-4} \\ &\text{soit } 1 \times \text{ tous les } 4212 \text{ nt } (= P^{-1}) \end{aligned}$$

Pour un segment de 1403 nt (taille du promoteur *Aox1*), la probabilité de rencontrer ce motif est :

$$P_{Aox1}(\text{GAATCG}) = 2,37 \times 10^{-4} \cdot 1403 = 0,333$$

Cette estimation repose toutefois sur l'hypothèse selon laquelle les bases du promoteur *Aox1* sont distribuées de manière aléatoire le long de la séquence, exactement comme si l'identité de chacune résultait du lancer indépendant d'un dé à quatre faces. Or, l'examen de la séquence démontre que ce n'est pas le cas puisqu'elle compte par exemple 121 dinucléotides TG pour seulement 106 dinucléotides GT (voir Annexe D, section D.2). Ce modèle du dé à quatre faces a d'ailleurs été remis en cause au cours des deux dernières décennies et les statisticiens lui préfèrent aujourd'hui une dépendance de Markov du premier ordre au minimum (Cowan 1991).

Quoiqu'il existe une formule markovienne permettant de calculer la probabilité d'apparition d'un motif dans une séquence à partir d'une matrice de son contenu dinucléotidique, celle-ci n'est pas triviale à appliquer. D'autre part, les recherches d'éléments conservés sont généralement effectuées sur

les deux brins de la région promotrice, ce qui a pour effet d'à peu près doubler les probabilités d'apparition de chaque motif (selon l'homogénéité des fréquences nucléotidiques et le traitement réservé aux palindromes). C'est pourquoi nous avons préféré confronter notre relevé d'éléments conservés à l'épreuve d'une étude de simulation dont les détails d'implémentation et les résultats bruts sont présentés aux sections D.4 et D.5 de l'Annexe D.

Un millier de séquences aléatoires de même longueur et de même contenu dinucléotidique que le promoteur *Aox1* ont été générées à l'aide du programme *shuffle* (GCG) et examinées à la recherche des 44 éléments conservés (*findpatterns*). Les apparitions (k) de ces motifs au travers des 1000 séquences aléatoires ont ensuite été comptabilisées et une distribution du nombre d'occurrences par séquence (n_k) établie pour chacun d'entre eux. Ces distributions ont permis de calculer deux valeurs par élément conservé, à savoir la fréquence d'apparition d'un élément par séquence aléatoire, désignée $F_{shuffle}$, ainsi que le pourcentage de séquences aléatoires présentant au moins une occurrence de cet élément, symbolisée par $F_{n_k > 1}$. Afin de tester la reproductibilité de la simulation, ce processus a été exécuté dix fois de suite et des valeurs moyennes ont été calculées pour chacun des motifs. Le Tableau 6.3 donne les résultats obtenus pour le motif GAATCG.

En posant que $F_{shuffle}$ est à la simulation ce que P_{Aox1} est à l'estimation probabiliste, il est possible de calculer F^{-1} , correspondant à la taille de la séquence contenant une fois le motif. On aura en outre F^{-1} comparable à P^{-1} si P_{Aox1} englobe les probabilités associées à chacun des deux brins du promoteur selon la formule :

$$P_{Aox1} = P_{Aox1, 5' \rightarrow 3'} + P_{Aox1, 3' \rightarrow 5'}$$

C'est précisément ce qui a été fait au Tableau 6.4 afin d'évaluer la signification statistique de la présence de quatre éléments conservés de 6 nt de long dans le promoteur *Aox1*. Remarquons que les estimations probabilistes sont proches des fréquences d'apparition des différents motifs. Cette conclusion ressort de la comparaison des colonnes P^{-1} et F^{-1} (respectivement dérivées de P_{Aox1} et $F_{shuffle}$). Ainsi, la GAATCG *box* attendue au rythme d'une occurrence toutes les 2123 pb apparaît une fois toutes les 2514 pb dans la simulation. À l'inverse, le motif CGCGCC se retrouve plus souvent que prévu dans les séquences aléatoires (903 vs 1146 pb). Ces divergences sont causées par le fait que le modèle du dé

TAB. 6.3. **Exemples de résultats de la simulation.** **A.** Distribution du nombre d'occurrences par séquence de la GAATCG *box* établie pour 1000 séquences aléatoires de 1403 nt. Les valeurs de $F_{shuffle}$ et de $F_{n_k > 1}$ qui en ont été tirées sont également fournies. **B.** Relevé des valeurs de $F_{shuffle}$ et de $F_{n_k > 1}$ obtenues pour la GAATCG *box* au cours des dix exécutions successives (voir texte).

A

nombre d'occurrences du motif par séquence	nombre de séquences concernées	$F_{shuffle}$	$F_{n_k > 1}$
1×	330	0,575	43,9 %
2×	85		
3×	21		
4×	3		
	575		

B

	valeurs trouvées lors des dix exécutions successives										moyenne
$F_{shuffle}$	0,575	0,548	0,552	0,539	0,568	0,533	0,575	0,564	0,588	0,539	0,558
$F_{n_k > 1}$	43,9	43,2	42,2	40,0	44,9	41,1	43,8	42,1	44,4	41,0	42,7

TAB. 6.4. **Comparaison des probabilités (modèle du dé à quatre faces) et des fréquences d'apparition (étude de simulation) de quatre éléments conservés de 6 nt de long dans le promoteur Aox1.** Références : a, Periz et Keller (1997) ; b, Hahn et Kuck (1999) ; c, Kucho et al. (1999).

séquence	réf.	$P_{Aox1, 5' \rightarrow 3'}$	$P_{Aox1, 3' \rightarrow 5'}$	P_{Aox1}	P^{-1}	$F_{shuffle}$	F^{-1}	$F_{n_k > 1}$
GAATCG	b	0,333	0,328	0,661	2 123	0,558	2 514	42,7
GGCGAG	b	0,546	0,453	0,999	1 404	0,904	1 552	60,0
CGGGCG	a	0,664	0,560	1,224	1 146	1,070	1 311	66,4
CGCGCC	c	0,560	0,664	1,224	1 146	1,553	903	79,1

à quatre faces néglige la préservation de la composition dinucléotidique de notre simulation. En effet, si cette dernière est relancée avec brassage complet des nucléotides composant le promoteur *Aox1*, les fréquences d'apparition rejoignent les estimations probabilistes (données non montrées).

D'un autre côté, les fréquences d'apparition présentées dans le Tableau 6.4 reflètent comme attendu la composition biaisée du génome nucléaire de *C. reinhardtii*, dans la mesure où les motifs contenant une ou plusieurs bases A/T (GAATCG *box* et GGCGAG *box*) se font plus rares que les éléments riches en G/C (GC-like *box* et motif CGCGCC). Par contre, la composition dinucléotidique du motif CGCGCC en fait l'élément le plus fréquent, alors que sa composition nucléotidique (et donc l'estimation probabiliste qui en découle) le donne à égalité avec la GC-like *box*.

Finalement, il nous faut mentionner qu'aucun des quatre éléments discutés ci-dessus n'apparaît dans moins de 40% des séquences aléatoires. Ainsi, ce sont près de 80% des séquences qui contiennent

l'une ou l'autre occurrence du motif CGCGCC (dont nous avons examiné plus haut deux apparitions sur trois ; voir Annexe D, section D.2), tandis que les deux derniers éléments conservés se retrouvent dans près des deux tiers d'entre elles.

En conclusion, il ressort de notre simulation que la recherche d'hexanucléotides conservés dans un segment de promoteur double brin de l'ordre du kilobase est dénuée de signification statistique. Par extension, la présence de motifs légèrement plus longs, mais dont la conservation ne dépasse pas 65 à 75 %, nous paraît tout aussi peu propice à interprétation biologique en dépit de l'abondante littérature qu'elle suscite généralement.

Troisième partie

Discussion

Chapitre 7

Discussion

7.1 Structures comparées des gènes *Aox1* et *Aox2*

Dans la première partie de ce travail, nous avons amplifié puis cloné un segment génomique de 5,3 kb correspondant au gène *Aox1* de *C. reinhardtii*. Au cours de l'analyse de sa séquence nucléotidique, nous avons relevé neuf substitutions par rapport au cDNA *Aox1* précédemment isolé, dont quatre concernant la région codante. Si deux d'entre elles affectent la troisième base du codon et ne modifient pas la séquence du polypeptide, les deux autres entraînent le remplacement d'un acide aminé modérément ou très conservé, ce qui suggère qu'elles peuvent être le fait d'erreurs d'incorporation de la DNA polymérase lors de la PCR. Dans le cas des deux substitutions conservatives, de même que pour les cinq mutations touchant la 3'-UTR, la possibilité d'une variation clonale entre les souches dont dérivent respectivement la séquence génomique et le cDNA ne peut être exclue.

Une des caractéristiques des gènes nucléaires de *C. reinhardtii* est qu'ils renferment généralement un grand nombre d'introns de petite taille (~220 pb en moyenne). Statistiquement, chaque kilobase de séquence codante comprend quatre introns et, dans un gène typique, les régions introniques occupent donc presque autant de place que les régions exoniques (Silflow 1998). De ce point de vue, les gènes *Aox1* et *Aox2* sont plutôt atypiques, dans la mesure où ils contiennent sept et onze introns (dont les tailles moyennes sont respectivement de 269 et 213 pb) pour des séquences codantes d'à peine plus d'un kilobase de long.

Un alignement de la structure des différents gènes *Aox* d'*A. thaliana* et du riz révèle une excellente conservation de la position des introns (Figure 7.1). Les exceptions comptent cependant le gène *Aox2*

d'*A. thaliana*, qui comprend quatre introns, l'intron additionnel se situant au sein du premier exon, ainsi que les gènes *Aox1b* du riz et *Aox1d* d'*A. thaliana*, qui ont pour leur part perdu l'intron de la seconde position conservée. Parmi les autres espèces multi-géniques pour l'AOX, seul le soja a été aussi bien étudié. Chez ce dernier, les introns des séquences de type *Aox1* et *Aox2* se trouvent aux mêmes positions que dans la plupart des gènes *Aox* végétaux (revue par Considine et al. 2002), dont l'archétype est le gène *Aox1* de *S. guttatum* (Rhoads et McIntosh 1993). L'exon 1 des gènes de plantes supérieures s'achève trois acides aminés au-delà de la cystéine régulatrice, tandis que l'exon 2 s'étend jusqu'au début de la première région hydrophobe, avec les exons 3 et 4 contenant le reste de la protéine. En comparaison, le gène *aod-1* de *N. crassa* présente trois exons, l'exon 1 correspondant au domaine N-terminal où les séquences végétales et fongiques commencent à converger, l'exon 2 à l'insert de 20 à 25 résidus spécifique aux champignons et l'exon 3 au reste de la protéine (Umbach et Siedow 2000).

Bien qu'au cours de l'évolution, la position des introns soit parfois conservée au sein de certains gènes (cas de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), chez *C. reinhardtii*, la plupart des introns occupent des positions uniques en comparaison des gènes homologues décrits chez les animaux, les plantes supérieures, les champignons ou les protistes (Silflow 1998). À cet égard, la situation des gènes *Aox1* et *Aox2* n'est pas différente puisque la position des introns qu'ils renferment leur est propre (Figure 7.1). Ajoutée à leur similitude structurelle et à leur faible identité avec les gènes des espèces végétales et fongiques examinées (voir Introduction, chapitre 3, section 3.3.2), cette observation suggère que les deux gènes *Aox* de *C. reinhardtii* dérivent d'un seul gène algal ancestral dans lequel les introns originaux (probablement cinq au total) oc-

cupaient déjà des positions différentes de celles rencontrées chez tous les autres organismes.

En dépit de leur très probable origine commune, le gène *Aox2* n'est que faiblement transcrit comparativement au gène *Aox1*. De plus, sa région promotrice est incapable de promouvoir l'expression

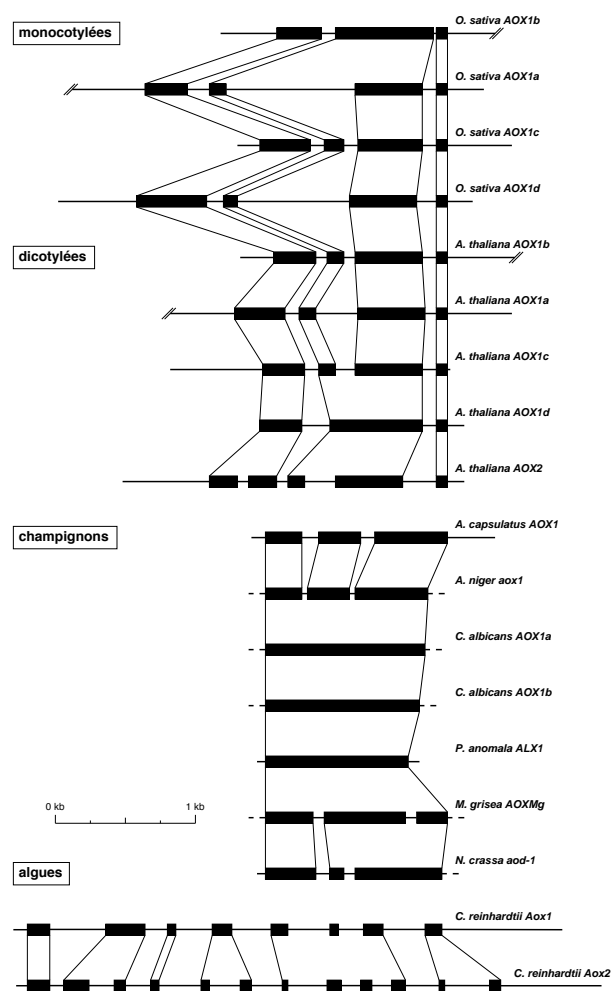


FIG. 7.1. Alignement des exons (rectangles noirs) homologues des gènes *Aox* caractérisés chez *Oriza sativa* (Ito et al. 1997; Considine et al. 2002), *Arabidopsis thaliana* (Kumar et Soll 1992; Saisho et al. 1997, 2001a; Considine et al. 2002), *Ajellomyces capsulatus* (Johnson and McEwen, non publié), *Aspergillus niger* (Kirimura et al. 1999), *Candida albicans* (Huh et Kang 1999, 2001), *Pichia anomala* (Sakajo et al. 1991), *Magnaporthe grisea* (Yukioka et al. 1998), *Neurospora crassa* (Li et al. 1996) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Dinant et al. 2001). La partie de la figure représentant les gènes *Aox* de plantes supérieures est adaptée de Considine et al. (2002), tandis que l'autre partie est inédite.

du gène rapporteur *Ars* dans une large gamme de conditions de culture. Enfin, alors qu'un segment de 100 pb choisi au début de la 3'-UTR du gène *Aox1* se retrouve dix fois dans les banques EST de *C. reinhardtii* (GenBank, Novembre 2002), la recherche d'un segment équivalent pour le gène *Aox2* ne donne aucun résultat. Le gène *Aox2* n'est cependant pas un pseudogène pour au moins quatre raisons : (i) sa séquence codante est dépourvue de tout codon d'arrêt intempestif ; (ii) les régions fonctionnellement importantes de la protéine y sont parfaitement conservées ; (iii) il a été détecté dans une banque cDNA et (iv) son messager est aisément amplifié par RT-PCR. En revanche, il est permis de se demander si ses 2,3 kb de régions introniques ne constituent pas un frein à son expression, et ce en dépit du fait que les introns soient souvent considérés comme nécessaires à la stabilisation des transcrits chez *C. reinhardtii* (Lumbreras et al. 1998). Par ailleurs, il n'est pas impossible que sa transcription soit limitée à des conditions spécifiques du cycle cellulaire, telles que, par exemple, la différenciation de la zygospore ou la germination du zygote.

7.2 Absence de réponse du gène *Aox1* aux inducteurs classiques

Dans un second temps, nous avons cloné et fusionné la région promotrice (1,4 kb) du gène *Aox1* au gène rapporteur *Ars* afin d'étudier la régulation transcriptionnelle du gène principal de l'AOX chez *C. reinhardtii*. Nous avons montré que l'expression de la construction chimérique n'était pas stimulée par la plupart des inducteurs classiques de la voie alternative, parmi lesquels des inhibiteurs respiratoires, des métaux lourds, des agents de stress (salin, osmotique et oxydant) et divers métabolites (cystéine, acides salicylique et citrique).

Quoique la majorité de ces composés soient connus pour activer la synthèse d'AOX chez les plantes supérieures et les champignons (voir Introduction, chapitre 2, section 2.4.2), des isoformes insensibles au blocage de la voie des cytochromes et à l'induction chimique ont été recensées chez plusieurs organismes. Ainsi, parmi les quatre ou cinq gènes *Aox* d'*A. thaliana*, seul le gène *Aox1a* voit son expression accrue suite à l'addition d'antimycine A (Saisho et al. 1997). De même, chez le soja, la transcription du gène *Aox1* est elle aussi induite par l'an-

timycine A, alors que celle des gènes *Aox2a* et *Aox2b* ne l'est pas (Tanudji et al. 1999). Enfin, chez *C. albicans*, le gène *Aox1a* ne réagit ni à l'antimycine A, ni aux autres inducteurs chimiques du gène *Aox1b* (Huh et Kang 2001).

Nos résultats montrent en outre que l'expression de la construction *Aox1/Ars* n'est pas plus élevée chez des cellules mutantes bloquées à différents niveaux de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale que chez des cellules de type sauvage. Il en est de même pour l'abondance des transcrits *Aox1* (Dinant et al. non publié), tandis que nos analyses sur *Western blots* révèlent pour leur part que l'accumulation de la protéine AOX chez une souche déficiente en complexe IV est du même ordre que chez une souche sauvage. Dès lors, il est surprenant que dans d'autres conditions expérimentales que les nôtres (en milieu minéral dépourvu de source de carbone organique), les hybridations sur *Northern blots* mettent en évidence une quantité de transcrits *Aox1* trois à quatre fois supérieure chez des mutants du complexe III (Dinant et al. 2001) et du complexe IV (Dinant et al. non publié). Si elle devait se confirmer, cette discordance serait, pour une raison inconnue, à mettre sur le compte de la composition du milieu de culture.

La régulation transcriptionnelle de l'AOX de *C. reinhardtii* est donc très différente de celle de ses homologues fongiques et végétaux. En effet, chez les champignons, l'activité de la voie alternative est nulle ou négligeable en conditions de culture normales et ne devient importante que lorsque la voie des cytochromes est bloquée chimiquement ou par mutation génique (Lambowitz et al. 1989; Sakajo et al. 1991; Minagawa et al. 1992; Li et al. 1996; Yukioka et al. 1998; Huh et Kang 1999, 2001). Avec les plantes supérieures, la situation est plus complexe puisque chez les dicotylédones, l'AOX est encodée par deux sous-familles géniques régulées distinctement. La sous-famille *Aox1* répond aux agents de stress et aux inhibiteurs respiratoires, alors que la sous-famille *Aox2* présente des spécificités tissulaires et développementales, mais reste indifférente aux inducteurs chimiques (Considine et al. 2002; voir aussi Introduction, chapitre 2, section 2.4.2). À l'inverse, la capacité de la voie alternative et la quantité de protéine AOX s'avèrent constitutivement élevées chez *C. reinhardtii*.

De plus, il a été rapporté récemment que la majorité des métabolites inducteurs de l'AOX (acide salicylique, cystéine, monofluoroacétate; Vanlerberghe et McIntosh 1996) ont en commun de favoriser di-

rectement ou indirectement la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), pouvant mener à leur tour à la perturbation des fonctions mitochondriales (Xie et Chen 1999; Maxwell et al. 2002). Dans le cadre d'une transduction du signal impliquant ROS et/ou dysfonctionnement de la mitochondrie, il paraît plutôt logique que le gène *Aox1* de *C. reinhardtii*, déjà bien exprimé en temps normal, ne réponde pas ou peu aux inhibiteurs ou mutations de la chaîne respiratoire, ni aux agents de stress oxydant, ni aux métabolites testés au cours de ce travail.

7.3 Régulation du gène *Aox1* par la source d'azote

Phénomène actuellement limité à *C. reinhardtii*, la quantité de transcrits *Aox1* varie selon la nature de la source d'azote (Quesada et al. 1998b, 2000). Parallèlement, l'effet le plus spectaculaire obtenu avec notre construction *Aox1/Ars* est une stimulation importante de l'activité ARS enregistrée lors du remplacement de l'ammonium par le nitrate, tandis que la combinaison des deux sources d'azote conduit à un niveau d'expression intermédiaire. Le simple retrait de l'ammonium (absence de source d'azote) se solde déjà par une augmentation significative de la transcription de la construction chimérique. Ces effets antagonistes de l'ammonium et du nitrate ont été confirmés au niveau protéique où une bande de 40 kDa correspondant vraisemblablement au polypeptide AOX1 voit son abondance modulée de concert avec l'activité ARS.

Nous avons par ailleurs montré que la stimulation par le nitrate débute à des concentrations aussi faibles que 50 μ M et augmente considérablement jusqu'à 1 mM, pour ensuite adopter une courbe d'accroissement beaucoup plus modeste. Chez les plantes supérieures, les algues et les champignons, de nombreux gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate ne sont efficacement exprimés que lorsque ce composé est présent dans le milieu de culture (*revue par* Fernandez et al. 1998; Galvan et Fernandez 2001; Orsel et al. 2002). Durant la dernière décennie, il est apparu que chez *C. reinhardtii*, l'accumulation intracellulaire du nitrate est sous la dépendance de plusieurs systèmes de transport spécifiques. Quatre transporteurs à haute affinité assurant l'importation du nitrate et du nitrite ont ainsi été identifiés. Ces systèmes de transport sont régulés différenciellement par la source d'azote et par la disponibilité en CO₂, tout en présentant des affini-

TAB. 7.1. Propriétés des systèmes de transport de nitrate et de nitrite identifiés chez *C. reinhardtii* (adapté de Galvan et Fernandez 2001). expression : conditions d'expression optimales ; inhibition : conditions de répression et/ou d'inhibition de l'activité ; HANT : transporteur à haute affinité pour le nitrate ; HANiT : transporteur à haute affinité pour le nitrite ; LANT : transporteur à faible affinité pour le nitrate. Références : a, Quesada et Fernandez (1994) ; b, Quesada et al. (1994) ; c, Galvan et al. (1996) ; d, Quesada et al. (1998b) ; e, Rexach et al. (1999) ; f, Navarro et al. (2000).

système	gènes	substrats	expression	inhibition	fonction	$K_m \text{ NO}_3^-$	réf.
I	<i>Nrt2;1-Nar2</i>	$\text{NO}_3^-, \text{NO}_2^-$	$+\text{NO}_3^-, +\text{CO}_2$	$+\text{NH}_4^+$	HANT/HANiT	1,6 μM	a, b, c
II	<i>Nrt2;2-Nar2</i>	NO_3^-	$+\text{NO}_3^-, +\text{CO}_2$	$+\text{NH}_4^+$	HANT	11 μM	a, b, c
III	<i>Nrt2;3</i>	$\text{NO}_3^-, \text{NO}_2^-$	$+\text{NO}_3^-, +\text{CO}_2$	$+\text{NH}_4^+$	LANT/HANiT	10 mM	d, e, f
IV	<i>Nrt2;4</i>	$\text{NO}_3^-, \text{NO}_2^-$	$+\text{NO}_2^-, -\text{CO}_2$	$+\text{CO}_2$	HANT/HANiT	40 μM	e, f

tés variées (K_m) pour leurs substrats (Tableau 7.1 ; voir aussi Galvan et Fernandez 2001). De plus, il est aujourd'hui clair que c'est le nitrate intracellulaire qui agit comme signal sur l'expression du gène *Nia1* et d'autres gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate (Llamas et al. 2002 ; Rexach et al. 2002). Dès lors, on peut émettre l'hypothèse que la stimulation de l'expression de la construction *Aox1/Ars* par le nitrate dépend elle aussi de l'activité de ces transporteurs. En particulier, la rupture observée entre les deux courbes de réponse de l'activité ARS à la concentration en nitrate pourrait refléter une transition entre deux de ces systèmes de transport.

Un des transporteurs à haute affinité, spécifique à la fois du nitrate et du nitrite (système IV), est connu pour fonctionner sous une faible pression partielle en CO_2 . À l'inverse des autres systèmes de transport, le système IV résiste à l'inhibition par l'ammonium (Tableau 7.1 ; voir aussi Rexach et al. 1999 ; Navarro et al. 2000). Cette capacité à importer du nitrate en présence d'ammonium serait en parfait accord avec les effets antagonistes de ces deux sources d'azote sur l'expression du gène *Aox1*. Cette même hypothèse a été proposée par Llamas et al. (2002) pour expliquer la régulation transcriptionnelle similaire du gène *Nia1*.

En milieu contenant du nitrate, nous avons montré que l'inactivation de la nitrate réductase par l'azoture de sodium, le tungstate ou la mutation du gène *Nia1* augmente encore l'expression de la construction chimérique. Le mécanisme le plus probable, déjà évoqué par Rexach et al. (2002) pour d'autres gènes régulés par la source d'azote, est que le nitrate intracellulaire, accumulé de manière importante en absence de nitrate réductase, constitue un signal positif continu menant à la surexpression du gène *Aox1*. Un tel modèle expliquerait également la spectaculaire abondance du transcrit *Aox1* obser-

vée chez le mutant *G1* de *C. reinhardtii*, dépourvu de six gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate (dont le gène *Nia1*), mais retenant très probablement un système IV fonctionnel (Quesada et al. 1993, 1998a,b ; Navarro et al. 2000).

La bande à 75 kDa obtenue après traitement à l'azoture de cellules cultivées en présence de nitrate pourrait correspondre à une forme dimérique de l'AOX. Toutefois, le domaine de dimérisation putatif contenant la cystéine régulatrice typique des plantes supérieures est absent des deux AOXs de *C. reinhardtii*, de même que des séquences AOX de champignons (Umbach et Siedow 2000 ; Dinant et al. 2001). En outre, l'activité de l'enzyme algale n'est pas stimulée par le pyruvate (M. Dinant, communication personnelle). Puisque le traitement au dithiothreitol (agent réducteur des ponts disulfures) ne conduit pas à la disparition de la bande à 75 kDa (données non montrées), ce signal correspond sans doute à un artefact, peut-être lié au chauffage de l'échantillon, comme suggéré pour l'AOX d'*Acanthamoeba castellanii* (Jarmuszkiewicz et al. 1997).

7.4 Effet résiduel de l'azoture de sodium sur le gène *Aox1*

Quoique l'effet majeur de l'azoture de sodium se produise *via* l'inhibition de la nitrate réductase en milieu contenant du nitrate, une légère stimulation de l'expression en présence de cet inhibiteur est également observée aux niveaux transcriptionnel et protéique lorsque des cellules de type sauvage sont cultivées avec l'ammonium comme seule source d'azote. Cet effet résiduel est aussi détecté au niveau de l'accumulation de la protéine AOX chez le mutant *dum19*, ce qui montre que la stimulation

est indépendante de l'inhibition de la cytochrome *c* oxydase. Donc, au-delà de son action sur la nitrate réductase, l'azoture de sodium favorise la synthèse du polypeptide AOX en affectant un autre système enzymatique non identifié.

En raison de sa chimie particulière, les cibles potentielles de cet inhibiteur sont nombreuses (*revue par* Smith et Wilcox 1994). Les enzymes sensibles à l'azoture chez les végétaux et les champignons concernent des voies métaboliques aussi variées que l'assimilation du carbone et de l'azote, la biosynthèse des alcaloïdes et des flavonoïdes, le métabolisme du soufre et des acides aminés, ou encore la protection contre les ROS (*voir* Annexe C).

En présence d'ammonium, la plupart des gènes liés à l'assimilation du nitrate sont réprimés. C'est notamment le cas des nitrate et nitrite réductases, ainsi que de la L-amino acide oxydase (*revue par* Fernandez et al. 1998 ; Quesada et al. 2000), toutes trois sensibles à l'azoture. D'un autre côté, puisque l'expression du gène *Aox1* de *C. reinhardtii* ne paraît vraiment pas sous le contrôle des ROS, des enzymes telles que les catalases, peroxydases et autres superoxyde dismutases (*revue par* Smith et Wilcox 1994), sensibles elles aussi à l'azoture, sont probablement de mauvaises candidates à un rôle dans l'effet résiduel de l'inhibiteur.

Par contre, en s'appuyant sur l'hypothèse de l'*energy overflow* (Lambers 1982), on pourrait suggérer que les cibles potentielles sont à rechercher parmi les enzymes impliquées dans les voies métaboliques du carbone. L'azoture de sodium est en effet réputé pour inhiber plusieurs d'entre elles, parmi lesquelles l'alcool déshydrogénase (fermentation), l'isocitrate déshydrogénase à NAD⁺ (cycle TCA), la glycolate déshydrogénase (photorespiration) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase à ATP (néoglucogenèse ; *voir* Annexe C ; *revue par* Salisbury et Ross 1992 ; Hill 1997 ; Spalding 1998).

7.5 Structure du promoteur *Aox1*

Chez *C. reinhardtii*, les séquences régulatrices sont généralement situées 200 à 300 pb en amont de l'origine de transcription (*revue par* Kindle 1998). Cette observation est en accord avec notre étude de délétion démontrant qu'un promoteur raccourci équivalent au segment -253 à +59 du gène *Aox1* est suffisant pour assurer transcription et régulation basales au gène rapporteur *Ars* (Figure 7.2-A).

Par ailleurs, des constructions chimériques porteuses d'un promoteur minimal de 35 pb dérivé du gène *TubB2* suggèrent que des éléments du gène *Aox1* situés entre les positions -133 et -39 sont requis pour l'expression basale, tandis que des éléments conférant la réponse à la source d'azote et à l'azoture de sodium doivent se trouver dans la région -39 à +59 (Figure 7.2-A).

Nous avons en outre montré que des éléments distaux sont impliqués dans l'amplitude de l'expression et de la régulation du gène *Aox1* (Figure 7.2-A). Puisque les fragments de promoteur *Aox1* des constructions les plus régulées remontent jusqu'à la région promotrice du gène *Nrt2;3*, il est tentant de spéculer sur la possible influence d'un amplificateur de *Nrt2;3* sur l'expression du gène *Aox1*. En effet, les amplificateurs sont capables de moduler la transcription indépendamment de leur orientation et sur une large gamme de distances par rapport aux éléments de la région promotrice (Banerji et al. 1981). De plus, la régulation par la source d'azote du gène *Nrt2;3* est largement similaire à celle du gène *Aox1*, quoique pas totalement identique, ce dernier n'étant pas sous le contrôle du régulateur positif NIT2 (Quesada et al. 1998b).

La Figure 7.2-B résume en un modèle l'ensemble des données relatives à la régulation du gène *Aox1* par la source d'azote, la nitrate réductase, l'azoture et le tungstate.

Au sujet d'éventuels éléments conservés dans la région promotrice du gène *Aox1*, une analyse informatique du segment de 1,4 kb a révélé la présence de 18 motifs nucléotidiques potentiellement impliqués dans la régulation transcriptionnelle chez *C. reinhardtii*, 10 d'entre eux étant différents. Parmi les hexanucléotides conservés, nous avons reconnu deux boîtes précédemment identifiées dans quelques gènes induits par la lumière, un motif de réponse aux faibles concentrations en CO₂ et une boîte commune aux promoteurs des quatre gènes tubulines (Figure 7.2-A).

Néanmoins, une étude de simulation conduite sur plusieurs milliers de séquences aléatoires de longueur et de composition dinucléotidique identiques à celles du promoteur *Aox1* tend à prouver que la présence d'éléments conservés de 6 nt dans un segment double brin de 1,4 kb n'autorise aucune interprétation statistiquement étayée. Cette conclusion est d'ailleurs soutenue par le fait que le gène *Aox1* se montre plutôt légèrement réprimé par la lumière (données non montrées), tandis que le produit du gène *Nrt2;3* fonctionne préférentiellement

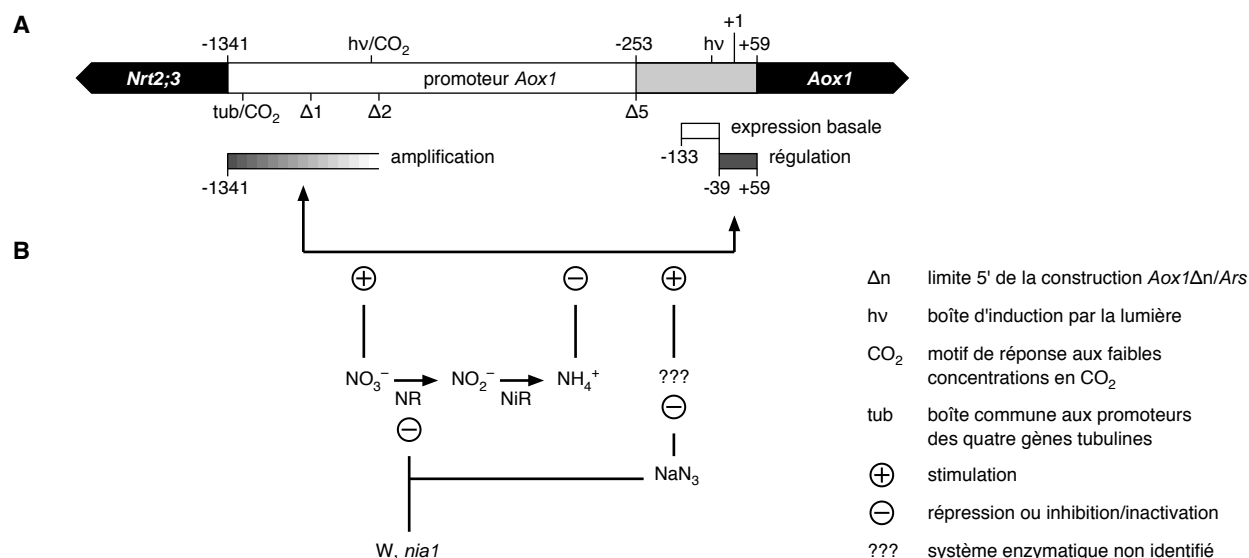


FIG. 7.2. **Synthèse des résultats de l'analyse du promoteur Aox1.** A. Représentation schématique des régions promotrices des gènes *Nrt2;3* et *Aox1* montrant la taille et la localisation des segments critiques pour l'expression et la régulation du gène *Aox1*, de même que la position des divers éléments conservés. Le promoteur *Aox1* minimal est montré en gris clair, tandis que les sous-fragments nécessaires à l'expression basale et à la régulation sont respectivement identifiés par des rectangles blanc et gris foncé. L'élément distal impliqué dans l'amplification de la transcription est quant à lui symbolisé par un rectangle en dégradé. B. Modèle de la régulation du gène *Aox1* par la source d'azote et l'azoture de sodium. NR : nitrate réductase ; NiR : nitrite réductase ; W : tungstate ; *nia1* : mutation du gène *Nia1*.

à haute pression partielle en CO₂ (Tableau 7.1 ; voir aussi Quesada et al. 1998b ; Rexach et al. 1999 ; Navarro et al. 2000).

Dans le même ordre d'idées, notons que pareille recherche de motifs effectuée sur la région promotrice (1,1 kb) du gène *Aox2* permet d'identifier 21 éléments conservés, dont 9 sont différents. Parmi ceux-ci, se retrouvent trois des quatre boîtes relevées pour le gène *Aox1* et desquelles ne manque qu'un des éléments de réponse à la lumière (voir Annexe D, section D.3). Considérant le niveau d'expression très faible du gène *Aox2*, nous voyons là une raison supplémentaire de ne pas accorder de crédit à la présence de ces motifs dans le promoteur *Aox1*. Une *linker-scanning mutagenesis* serait par contre un bon moyen d'identification des éléments conservés responsables de la régulation du gène *Aox1* (Quinn et al. 2000 ; Loppes et Radoux 2002).

7.6 Signification physiologique de la régulation de l'AOX

Manifestement, nos observations posent la question de la signification physiologique de la régulation de

l'AOX par la source d'azote. Chez les végétaux, la réduction du nitrate en nitrite, puis en ammonium et en glutamate, est un processus photosynthétique qui consomme dix électrons, dont huit dans le chloroplaste. Ces réactions requièrent des équivalents réducteurs, de l'ATP et des squelettes hydrocarbonés, parmi lesquels le 2-oxoglutarate (OG ou α -céto-glutarate). La première réaction est catalysée par la nitrate réductase et prend place dans le cytosol ; elle utilise le NAD(P)H + H⁺ comme source d'électrons (Figure 7.3). À la lumière, les trois autres réactions se déroulent dans le chloroplaste. Elles nécessitent des équivalents réducteurs et de l'ATP, produits de concert par la phase claire de la photosynthèse, alors que l'OG provient de la glycolyse et du cycle TCA (revue par Turpin et al. 1997). L'assimilation du nitrate chez les organismes photosynthétiques est certainement un phénomène complexe et la régulation des interactions entre photosynthèse, catabolisme respiratoire et métabolisme azoté est encore loin d'être élucidée (revue par Turpin et al. 1997).

Chez *Chlamydomonas*, deux glutamine synthases (GS1 et GS2) ont été identifiées : la première, non chloroplastique, s'accumule à l'obscurité, tandis que la seconde, localisée dans le plaste, prédomine

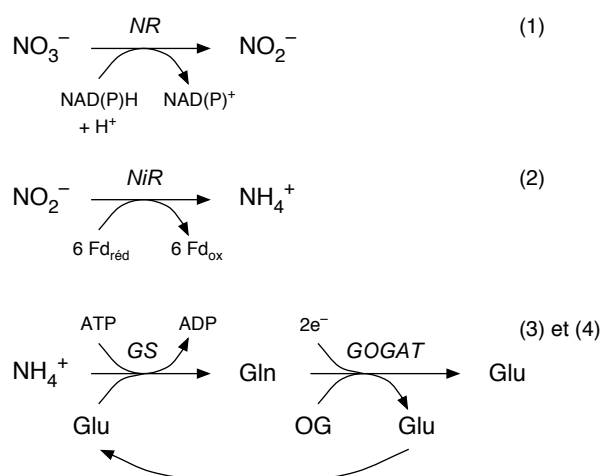


FIG. 7.3. Réactions d'assimilation du nitrate et cycle GS/GOGAT. NR: nitrate réductase; NiR: nitrite réductase; GS: glutamine synthase; GOGAT: glutamine:2-oxoglutarate aminotransférase; Fd_{red}/Fd_{ox}: ferrédoxine réduite/oxydée; Gln: Glutamine; Glu: glutamate; OG: 2-oxoglutarate (*adapté de Turpin et al. 1997*).

dans les cellules cultivées à la lumière. Deux GOGATs sont également présentes : la NADH-GOGAT cytosolique est couplée à la GS1, tandis que la ferrédoxine-GOGAT chloroplastique est associée à la GS2 (Marquez et al. 1984, 1986). Les données de Fischer et Klein (1988) suggèrent cependant que les deux GOGATs sont localisées dans le chloroplaste (*revue par Fernandez et al. 1998*).

Chez les plantes supérieures (Bloom et al. 1989; de la Torre et al. 1991) et plusieurs algues unicellulaires (Larsson et al. 1982; Romero et Lara 1987), le dégagement d'oxygène photosynthétique est stimulé lorsque la source d'azote est fournie sous forme de nitrate plutôt que d'ammonium, ce qui indique que le transport non cyclique d'électrons de la phase claire doit augmenter pour faire face à la demande en équivalents réducteurs requis par la réduction du nitrate en ammonium. Ainsi que le suggère Quesada et al. (2000), la réduction du nitrate et du nitrite pourrait s'accompagner d'une production accrue d'ATP photosynthétique par rapport à celle observée lors de l'utilisation de l'ammonium. Dans ce contexte, la stimulation spécifique de l'expression de l'AOX par le nitrate pourrait traduire la nécessité pour la cellule de modifier la répartition des électrons entre les deux voies de la respiration afin de réduire la synthèse d'ATP mitochondrial tout en maintenant l'activité respiratoire nécessaire au fonctionnement de la glycolyse et du cycle TCA.

D'un autre côté, la régulation de l'AOX par l'ammonium et le nitrate, observée tant au niveau transcriptionnel qu'aux niveaux protéique et respiratoire, pourrait être simplement due à la présence d'éléments régulateurs communs aux gènes *Aox1* et *Nrt2;3*. Des recherches supplémentaires sur d'autres organismes photosynthétiques — et sur les plantes supérieures en particulier — devraient permettre de clarifier cette intéressante question.

Quatrième partie

Matériel et Méthodes

Chapitre 8

Matériel

8.1 Souches de microorganismes

Deux espèces de microorganismes ont été utilisées au cours de nos expériences : l'eubactérie *Escherichia coli* DH5 α , de génotype deoR - endA1 - hsdR17 - supE44 - thi1 - recA1 - gyrA96 - relA1 - Δ (lacZYA-argFV169) - ϕ 80 δ lacZ Δ M15, comme hôte de toutes les constructions moléculaires, et l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Le Tableau 8.1 (p. 68) reprend les différentes souches d'algue employées et leurs caractéristiques.

8.2 Plasmides

Cinq plasmides ont été utilisés dans le cadre de ce travail, soit tels quels (pASL), soit comme base à nos propres constructions (pJD54 et pJD100), soit encore comme vecteurs de clonage (pGEM-T Easy et pBluescript II KS+). Décrits ci-dessous, ils sont présentés à la Figure 8.1 (p. 69).

pASL (Adam et Loppes 1998)

Ce plasmide de 11,0 kb résulte de l'insertion, aux sites *Bam*HI et *Sal*I du pBCKS+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA), d'un fragment *Sal*I-*Sau*3A de 7,8 kb porteur du gène *Arg7* encodant l'argininosuccinate lyase (ASL) de *C. reinhardtii* (Debuchy et al. 1989). Sa capacité à compléter l'auxotrophie vis-à-vis de l'arginine des souches mutées au locus *Arg7* en fait un excellent marqueur de sélection pour la transformation de cet organisme.

pJD54 (Davies et al. 1992)

Ce plasmide de 10,0 kb résulte de l'insertion, au site *Eco*RI du pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA), d'un fragment *Sfi*I-*Sal*I de 7,0 kb porteur du

gène *Ars* encodant l'arylsulfatase (ARS) de *C. reinhardtii* (de Hostos et al. 1989). Le gène *Ars* est dépourvu de région promotrice, mais la construction dispose de deux sites de restriction uniques (*Kpn*I et *Sal*I) permettant de cloner un promoteur en amont de la séquence codante *Ars* (voir Annexe B.1.1).

pJD100 (Davies et Grossman 1994)

Ce plasmide de 10,1 kb résulte de l'insertion, au site *Sal*I du pJD54, d'un fragment *Sal*I-*Sal*I de 108 pb porteur du promoteur minimal (35 pb) du gène *TubB2* encodant une β -tubuline exprimée constitutivement (Goldschmidt-Clermont et Rahire 1986). La construction dispose encore d'un site unique *Kpn*I permettant de cloner un segment de promoteur à étudier en amont du promoteur minimal et de la séquence codante *Ars* (voir Annexe B.1.2).

pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA)

Ce plasmide est un vecteur de 3,0 kb conçu pour le *T/A cloning* des produits de PCR. Linéarisé par *Eco*RV, il est fourni pourvu d'extrémités 5'-T compatibles avec les 3'-A ajoutées de part et d'autre des fragments amplifiés par les polymérases ne présentant pas d'activité exonucléasique 3' \rightarrow 5' (typiquement, la *Taq* DNA polymérase). La présence du gène *lacZ* rend possible le criblage des bactéries recombinantes par le test *blanc-bleu* (voir chapitre 9, section 9.2.1). Par ailleurs, deux sites *Eco*RI encadrant le site de clonage facilitent grandement la récupération ultérieure de l'insert.

pBluescript II KS+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

pBluescript II KS+ est un vecteur de clonage de 3,0 kb permettant lui aussi le test *blanc-bleu*.

TAB. 8.1. **Génotypes des souches de *C. reinhardtii* utilisées.** *arg7*: mutation du gène *Arg7* encodant l'argininosuccinate lyase, dernière enzyme de la biosynthèse de l'arginine; *cw15*: mutation conduisant à l'absence de paroi glycoprotéique; *nia1*: mutation du gène *Nia1* encodant la nitrate réductase, première enzyme de la voie d'assimilation du nitrate; *nit2*: mutation du gène *Nit2* encodant un régulateur positif de gènes régulés par la source d'azote; *mt⁺*, *mt⁻*: allèles déterminant le type sexuel (*mating type plus/moins*); *dum2*: délétion de ~1,5 kb dans la région 5' terminale du génome mitochondrial incluant le gène *cob* (Matagne et al. 1989); *dum19*: délétion d'une thymine au codon 152 du gène mitochondrial *cox1* (Colin et al. 1995); *dum20*: délétion d'une thymine au codon 243 du gène mitochondrial *nd1* (Remacle et al. 2001a); *dum24*: délétion de ~3,4 kb dans la région 5' terminale du génome mitochondrial incluant les gènes *cob*, *nd4* et l'extrémité du gène *nd5* (Duby et Matagne 1999); *dum25*: délétion de 6 pb conduisant à la perte de deux codons successifs du gène *nd1* (Remacle et al. 2001a); *spr*: mutation ponctuelle du rRNA 16S chloroplastique conférant la résistance à la spectinomycine (Harris 1989).

souche	marqueurs nucléaires	mitoch.	chloro.
25	<i>cw15 nia1 nit2 mt⁺</i>		
83	<i>cw15 nia1⁺ nit2⁺ mt⁺</i>		
193	<i>cw15 nia1⁺ nit2⁺ mt⁻</i>	<i>dum19</i>	
325	<i>cw15 arg7 nia1⁺ nit2⁺ mt⁺</i>		
388	<i>cw15 arg7 nia1 nit2⁺ mt⁺</i>		
69	<i>cw15 nia1 nit2⁺ mt⁻</i>		
235	<i>nia1 nit2 mt⁻</i>	<i>dum20</i>	
228	<i>nia1 nit2 mt⁻</i>	<i>dum25</i>	
166	<i>nia1 nit2 mt⁻</i>	<i>dum2</i>	
239	<i>nia1 nit2 mt⁻</i>	<i>dum19</i>	
283	<i>nia1 nit2 mt⁻</i>	<i>dum24</i>	
629	<i>arg7 nia1 nit2 mt⁻</i>	<i>dum25</i>	<i>spr</i>

8.3 Oligonucléotides

Les oligonucléotides nécessaires aux amplifications par PCR et aux réactions de séquençage ont été conçus à l'aide du logiciel Primer Express 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et synthétisés par Oligo Express (Paris, France). La liste en est donnée au Tableau 8.2 (p. 70).

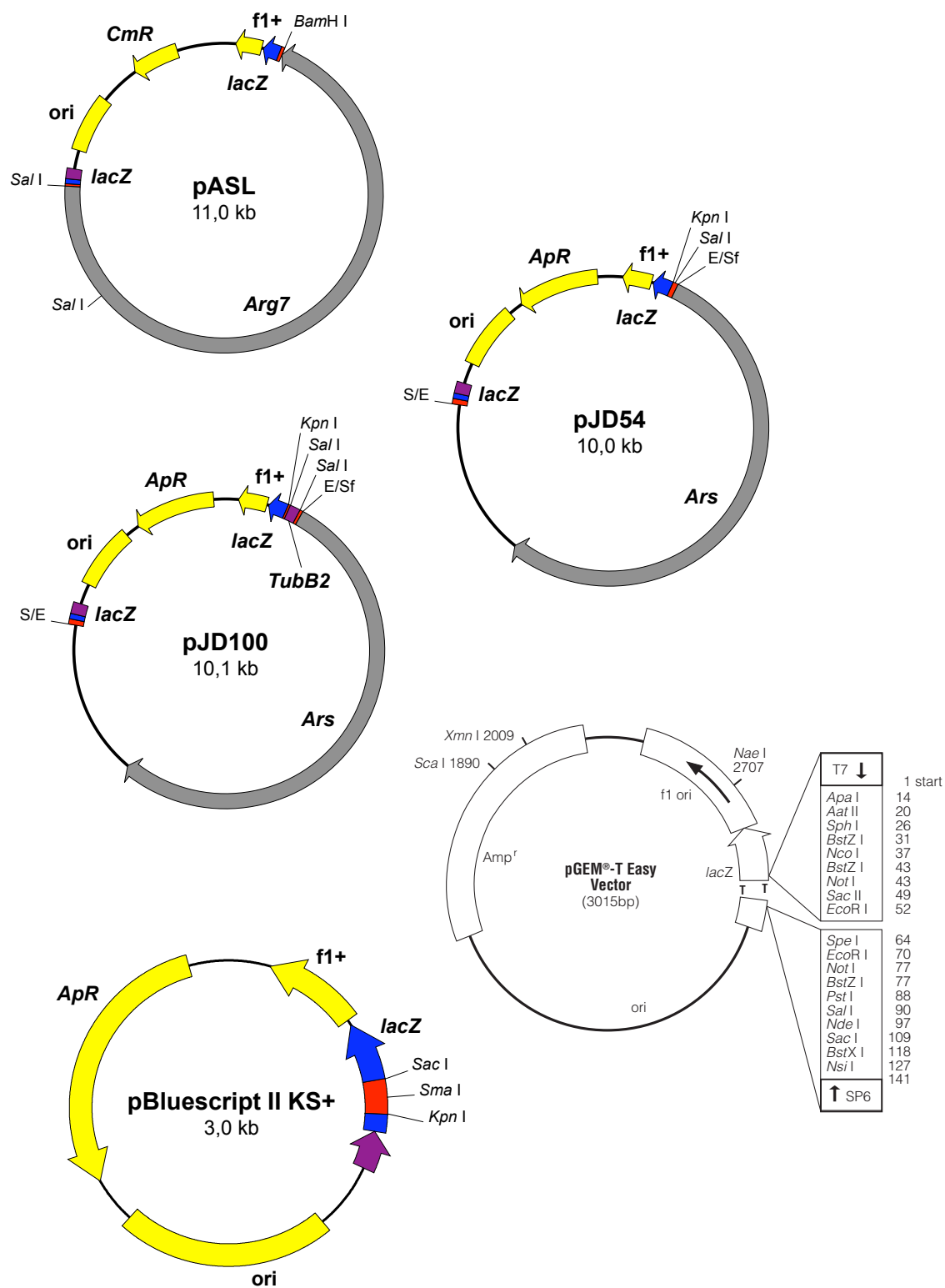


FIG. 8.1. Représentation schématique des plasmides et vecteurs de clonage utilisés. ApR (ou Amp^r) : gène de résistance à l'ampicilline; CmR : gène de résistance au chloramphénicol; lacZ : gène du fragment α de la β -galactosidase; f1+ (ou f1 ori) : origine de répllication phagique; ori : origine de répllication bactérienne; TubB2 : promoteur minimal du gène TubB2; E/Sf : jonction EcoRI-SfiI; S/E : jonction SalI-EcoRI.

TAB. 8.2. Liste des oligonucléotides. Les sites de restriction introduits sont soulignés. num : numéro ; lg (nt) : longueur.

num	désignation	lg (nt)	T _m (°C)	séquence (5' → 3')	gène
1	FH-AOX1-1R	20	59	GCTGGTTCTGCGCTTTTCCG	<i>Aox1</i>
2	NRT23-5'R	25	61	AAGTAGTCGACGCCTGTAGACATTC	<i>Nrt2;3</i>
3	NRT23-5'R-L	30	65	AAGTAGTCGACGCCTGTAGACATTCTTGCG	<i>Nrt2;3</i>
4	FH-AOX1-3R	22	60	CTTCCGCTGATGGCCTATGTAC	<i>Aox1</i>
5	FH-AOX1-2F	20	55	TTCCGAGCTATTATCGTGCC	<i>Aox1</i>
6	MDRP4	24	60	TATGGAGCCCAGAAGACGAGAAGC	<i>Aox1</i>
7	IN-PAOX1-F	22	64	TACGTACCGTGCTGCGAGGAGC	<i>Aox1</i>
8	FH-AOX1-4F	20	64	GGCCACCGTGCTTCTGTGC	<i>Aox1</i>
9	ST-CAOX1-F	20	57	TGCTTCAGACCGCACCTATG	<i>Aox1</i>
10	IN-CAOX1-R	22	70	GACTCCGCCAGAGCCGCGTCGC	<i>Aox1</i>
11	MID-AOX1-R	20	59	GCGAGCTTGTTAGCCTAGGAG	<i>Aox1</i>
12	IN-CAOX1-F	22	67	CCCCACCCCGGCATCAACCCAG	<i>Aox1</i>
13	FH-AOX1-5R	20	62	CCACCTGCGCCAGAATGACC	<i>Aox1</i>
14	MID-AOX1-F	20	59	CCTCCTAGGCTACAAGCTCG	<i>Aox1</i>
15	FH-AOX1-6F	20	62	GAGGAGACCGAGAACGAGCG	<i>Aox1</i>
16	NY-AOX1-R	20	57	TTCTTGACAGCCTCCTCCTC	<i>Aox1</i>
17	NE-AOX1-R	21	68	GGCCCTTGACGACCGGCACC	<i>Aox1</i>
18	NY-AOX1-F	20	59	CCCACCTCTCTCAGTTCTGTG	<i>Aox1</i>
19	FH-AOX1-7R	21	60	CGGCTGATGACTAGTATGCCG	<i>Aox1</i>
20	AOX1-3'R-L	34	63	GTTCAATTCTCAAAGCATTACACTTTTCTCCAGAC	<i>Aox1</i>
21	NE-AOX1-F	20	57	CCCCATGTACGGATGAAAGC	<i>Aox1</i>
22	AOX1-3'R	26	58	TCTCAAAGCATTACACTTTTCTCCAG	<i>Aox1</i>
23	FH-AOX1-8F	20	59	AGGTCCCGGTCTAGCCATAC	<i>Aox1</i>
24	AOX1-ARS-F	21	58	TGCTCGAATCGTCTACACTGG	<i>Aox1</i>
25	AOX1-ARS-R	20	57	TTCTGAATGGCGTCTCGGTC	<i>Ars</i>
26	ARS-INT1-R	20	59	CCCCAGTCTACTCGGCATA	<i>Ars</i>
27	AOX19	19	59	TGCTCCTGCTGTCTGTGCT	<i>Aox2</i>
28	XHOI-235-F	25	64	GTTACTCGAGGTGCACGAAAAGCG	<i>Aox1</i>
29	XHOI-429-F	25	65	AACCCTCGAGGCGCTGCCAGAATGA	<i>Aox1</i>
30	XHOI-670-F	25	65	TTGGCTCGAGGTTTTCGGCATCCCC	<i>Aox1</i>
31	XHOI-898-F	25	64	TGTCCTCGAGATGACAGCGACCTAG	<i>Aox1</i>
32	XHOI-1111-F	25	70	CGGCCTCGAGGTGCAACCCGATGCG	<i>Aox1</i>
33	XHOI-1305-F	25	64	CCTGCTCGAGTCTCTACACTGGAA	<i>Aox1</i>
34	XHOI-1423-R	25	62	AAGCCTCGAGATATCGAACGGTGAC	<i>Aox1</i>
35	KPNI-1097-F	25	72	GCTCGGTACCCAGGGGCTCGGCCTC	<i>Aox1</i>
36	KPNI-1326-R	25	62	TCGAGGTACCAAGTGTAGACGATTCG	<i>Aox1</i>
37	KPNI-1232-R	25	70	CACTGGTACCGACCGCCGCGCAAC	<i>Aox1</i>
38	KPNI-1178-R	25	59	TATGGGTACCAACTTCAAGCACAGA	<i>Aox1</i>

Chapitre 9

Méthodes

9.1 Milieux et conditions de culture

9.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli est cultivée à 37 °C, sur milieu gélosé (1 % d'agar, Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA) ou en milieu liquide sous agitation mécanique (Sambrook et al. 1989).

Le milieu Luria-Bertani (LB) contient pour 1 litre : 10 g de bactotryptone (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), 5 g d'extrait de levure (Amersham) et 10 g de NaCl. Le pH est amené à 7 avec du NaOH. Après autoclavage, le milieu est additionné de 50 mg/l d'ampicilline ou de 34 mg/l de chloramphénicol pour la sélection.

9.1.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii est cultivée à 25 °C (Harris 1989) en lumière vive ($70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) continue sur milieu TAP contenant de l'acétate (conditions mixotrophes). Il est également possible de la cultiver à l'obscurité sur milieu TAP (conditions hétérotrophes) ou à la lumière sur milieu minéral dépourvu d'acétate (conditions photo-autotrophes).

Les milieux de culture (voir ci-dessous) sont stérilisés par autoclavage et peuvent être rendus solides par addition de 8 à 15 g/l d'agar (Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA).

TAP (Gorman et Levine 1965)

Le milieu TAP (Tris-Acétate-Phosphate) contient pour 1 litre : 50 ml de solution minérale A (NH_4Cl 8 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l, CaCl_2 1 g/l), 100 ml de Tris 0,2 M, 1 ml de tampon phosphate 1 M (K_2HPO_4 9,35 g/100 ml, KH_2PO_4 6,30 g/100 ml, pH 7) et 1 ml de solution d'oligo-éléments (EDTA 50 g/l,

H_3BO_3 11,40 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,00 g/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5,06 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,99 g/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,61 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,57 g/l et $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,10 g/l; Hutner et al. 1950). Il est tamponné à pH 7 à l'aide d'acide acétique glacial. L'acétate (~ 15 mM final) y sert de source de carbone exogène. Une variante de ce milieu contient 100 mg/l d'arginine pour permettre la croissance des souches *arg*⁻.

La source d'azote du milieu TAP standard est le NH_4Cl 7,5 mM de la solution minérale A. Pour les cultures liquides dévolues à l'étude de l'effet de la nature de la source d'azote, du TAP_{-N} est préparé à partir de solution minérale A-N ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l, CaCl_2 1 g/l), puis additionné de 10 ml de solution stock de NH_4Cl (TAP_{NH4}), NaNO_3 (TAP_{NO3}) ou NH_4NO_3 (TAP_{NH4NO3}), pour atteindre une concentration finale de 4 mM en source d'azote.

Les divers agents de stress, inhibiteurs et métabolites sont ajoutés stérilement après autoclavage. Sauf mention contraire, le NaN_3 est utilisé à une concentration de 200 μM .

Dans les expériences consacrées à l'étude de l'effet du tungstate, les milieux TAP_{NH4} et TAP_{NO3} sont d'abord préparés à partir d'une solution d'oligo-éléments dépourvue de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. Ils sont ensuite stérilement additionnés de Na_2WO_4 ou de Na_2MoO_4 (1 μM final). L'agar est par ailleurs préalablement lavé à plusieurs reprises à l'eau distillée (Loppes et al. 1999).

M-N (VanWinkle-Swift 1977)

Le milieu M-N (Minimal carencé en Azote) contient pour 1 litre : 50 ml de solution minérale A-N, 50 ml de solution B (K_2HPO_4 14,34 g/l, KH_2PO_4 7,26 g/l, pH 7, ajoutée après autoclavage), 1 ml de MgSO_4 1 M et 1 ml de solution d'oligo-éléments. Ce milieu dépourvu de source d'azote est utilisé pour induire la gamétogenèse et la maturation des zygotes.

9.2 Techniques microbiologiques

9.2.1 Transformation d'*Escherichia coli*

Les cellules compétentes (préparées et conservées à -80°C sous forme d'aliquotes de $500\ \mu\text{l}$) sont dégelées sur glace avant d'en prélever stérilement $100\ \mu\text{l}$ par transformation. Après ajout de l'ADN transformant ($5\ \mu\text{l}$ de mélange de ligation; voir section 9.4.11), les bactéries (souche DH5 α) sont maintenues sur glace pendant 30 min pour permettre l'adsorption de l'ADN sur leur paroi. Elles subissent ensuite 30 sec de choc thermique à 42°C au cours duquel les plasmides pénètrent dans les cellules. Après 2 min de retour sur glace, $400\ \mu\text{l}$ de milieu SOC liquide (bactotryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl_2 10 mM, MgSO_4 10 mM, glucose 20 mM) sont ajoutés et les bactéries sont incubées pendant 30 min à 37°C afin de favoriser l'expression de la résistance à l'antibiotique. Les cellules sont finalement étalées sur des boîtes de milieu LB + antibiotique à raison de trois dilutions de $50\ \mu\text{l}$ (1, 10 et $50\times$) par transformation. Après 16 h d'incubation à 37°C , les cellules transformées (résistantes à l'antibiotique) donnent naissance à des colonies visibles (Inoue et al. 1990).

Dans le cas du *T/A cloning*, il est possible d'utiliser la méthode de criblage blanc-bleu des bactéries recombinantes. Celle-ci est basée sur la capacité du marqueur $\phi 80\delta\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ de la souche DH5 α à compléter le gène *lacZ* de la β -galactosidase porté par le vecteur pGEM-T Easy et dans lequel se trouve le site de clonage. En présence d'un inducteur, l'IPTG ($500\ \mu\text{M}$), et d'un substrat chromogène de cette enzyme, l'*X-Gal* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside; $80\ \mu\text{g}/\text{ml}$), les bactéries complémentantes forment des colonies bleues aisément détectables. À l'inverse, les bactéries qui portent un plasmide recombinant (gène *lacZ* interrompu par un produit de PCR cloné) donnent des colonies blanches suite à l'absence de β -galactosidase fonctionnelle.

9.2.2 Transformation de *Chlamydomonas reinhardtii*

Deux boîtes fraîches de cellules sans paroi auxotrophes pour l'arginine (souche 325 ou 388) sont stérilement mises en suspension dans $4,5\ \text{ml}$ de milieu TAP liquide. La densité de la suspension est ajustée à $3 \times 10^8\ \text{cell}/\text{ml}$ à l'aide d'un compteur Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) et $500\ \mu\text{l}$ de

cellules sont placées dans des tubes de $12\ \text{ml}$ contenant $500\ \mu\text{l}$ de billes de verre ($\varnothing\ 1\ \text{mm}$; méthode de Kindle 1990). Après addition de $1\ \mu\text{g}$ de plasmide pASL (porteur du gène *Arg7*) et de $0,5$ à $5\ \mu\text{g}$ d'ADN co-transformant, les tubes sont uniformément vortexés 15 sec à puissance maximale (Genie 2, Scientific Industries, New York, NY, USA). Environ $10\ \text{ml}$ de TAP sont ensuite rapidement ajoutés afin de diluer les composés toxiques relargués par les cellules détruites au cours de l'opération. Une fois les billes de verre éliminées par transfert du surnageant dans de nouveaux tubes, les cellules sont concentrées par 5 min de centrifugation à $1200 \times g$ (Universal II, Hettich, Bäch, Suisse), puis remises en suspension dans $400\ \mu\text{l}$ de TAP liquide et enfin délicatement étalées sur une ou deux boîte(s) de milieu TAP gélosé (0,8% d'agar) dépourvu d'arginine. Après six à huit jours d'exposition à la lumière vive, quelques centaines de colonies transformantes (*arg*⁺) capables de se multiplier en l'absence d'arginine se détachent nettement du tapis de cellules mortes non transformées (*arg*⁻). À ce stade, il est possible de récupérer individuellement des clones transformants en vue de leur analyse ultérieure ou de les reprendre en vrac (environ 200 à 300 colonies) dans $1\ \text{ml}$ de TAP liquide avant de les réétaler en *pool* sur milieu TAP gélosé.

9.2.3 Croisement de *Chlamydomonas reinhardtii*

Les cellules des deux souches à croiser sont mises en suspension dans $1,5\ \text{ml}$ de milieu M-N liquide stérile ($\sim 1 \times 10^6\ \text{cell}/\text{ml}$), puis exposées une nuit à la lumière vive afin d'induire la gamétogenèse. Le lendemain, une goutte de chaque suspension est examinée à la loupe binoculaire pour contrôler la mobilité des cellules. Ensuite, les deux tubes sont mélangés et remis à la lumière. Après 1 h de copulation, $2 \times 500\ \mu\text{l}$ du mélange sontensemencés sur milieu M-N gélosé et les boîtes sont incubées 4 à 6 jours à la lumière. Au cours de la maturation des zygospores, les cellules n'ayant pas copulé forment un film à la surface de l'agar, tandis que les zygotes s'enkystent plus profondément. Après raclage de la surface des boîtes à l'aide d'une lame de rasoir stérilisée (élimination des cellules végétatives), de petits blocs d'agar contenant une cinquantaine de zygotes sont prélevés et transférés sur milieu TAP gélosé frais. Avant d'être exposées à la lumière, les boîtes sont traitées 35 sec aux vapeurs de chloroforme afin de tuer les éventuelles cellules végétatives non élimi-

nées par raclage. La présence d'azote dans le milieu déclenche en 16 à 24 h la germination des zygotes, dont les produits de méiose sont finalement étalés à l'aide de 200 μ l d'eau stérile. Quelques jours plus tard, chaque spore isolée donne naissance à une colonie clonale (Harris 1989).

9.2.4 Cytoduction de *Chlamydomonas reinhardtii*

Après conjugaison entre gamètes de sexe opposé, un dicaryon transitoire est formé avant que les deux noyaux ne fusionnent (dans les 4 à 6 h suivant la copulation). Le jeune zygote diploïde se différencie ensuite généralement en une zygospore dormante capable de subir la méiose (voir section 9.2.3) ou, plus rarement (2 à 10 % des cas), entre en mitose pour donner naissance à une descendance diploïde stable. Toutefois, une large proportion de ces jeunes zygotes mitotiques se divisent en fait avant la fusion de leurs noyaux. On obtient dès lors des cellules possédant le noyau haploïde de l'un ou l'autre des parents, mais un mélange des deux cytoplasmes parentaux (= cytoductants). En utilisant par exemple un marqueur chloroplastique (tel que la résistance à la spectinomycine, *spr*) couplé à un ou plusieurs marqueurs nucléaires, il est possible de sélectionner des cytoductants haploïdes porteurs du génome nucléaire d'un des parents combiné au génome chloroplastique de l'autre parent et aux génomes mitochondriaux des deux parents (Matagne et al. 1991).

Pour construire un clone haploïde possédant le génome nucléaire du transformant 6 et le génome mitochondrial porteur de la mutation *dum25* (voir Résultats, chapitre 5, section 5.4.2), on a procédé de la manière suivante. Le clone 6 a été croisé avec la souche 629 et le mélange de copulation a été étalé sur milieu TAP_{NO3} + spectinomycine (contre-sélection des cellules parentales incapables d'assimiler le nitrate, auxotrophes pour l'arginine ou sensibles à la spectinomycine). Une vingtaine de colonies NR⁺ *arg*⁺ *spr* et phénotypiquement sans paroi (= cytoductants) ont été reprises sur le même milieu sélectif, puis sous-clonées afin d'isoler des colonies homoplasmiques pour le caractère *dum25* (voir Remacle et Matagne 1998 pour le passage de l'état hétéroplasmique à l'état homoplasmique).

9.2.5 Analyse phénotypique en gouttes

Des cellules repiquées de la veille sur milieu gélosé frais sont mises en suspension en milieu M-N li-

quide à une densité de 1×10^7 et 1×10^6 cell/ml. Des gouttes de 15 μ l de chaque suspension sont alors déposées sur différents milieux gélosés. Après 3 à 5 jours d'exposition à la lumière (ou 8 à 10 jours à l'obscurité), les boîtes sont examinées et les phénotypes des clones à analyser sont comparés à ceux de souches de référence.

9.2.6 Analyse phénotypique par répliques

Les transformants ou les descendants de croisements sont repris individuellement à l'aide de cure-dents stériles et ordonnés à raison de 25 ou 60 colonies par boîte de Pétri. En vue d'analyser leur phénotype, les colonies sont alors répliquées sur différents milieux gélosés en utilisant du papier filtre stérile comme support de transfert. Après 2 ou 3 jours d'exposition à la lumière, les boîtes sont examinées et les clones recherchés sont récupérés.

9.3 Techniques biochimiques

Toutes les mesures ou cinétiques d'absorbance ont été effectuées à 25 °C à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis Lambda 20 sous le contrôle du logiciel UV WinLab (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). Tous les produits chimiques proviennent de la firme Sigma (Saint Louis, MO, USA).

9.3.1 Détection *in situ* de l'activité arylsulfatase

Afin de mettre en évidence l'arylsulfatase accumulée dans l'agar au niveau des colonies de *C. reinhardtii*, l' α -naphthylsulfate est employé comme substrat en combinaison avec l'orthodanisidine tétra-azotée. En pratique, les colonies sont éliminées de la surface de l'agar par raclage, puis les boîtes sont recouvertes de 10 ml de solution de détection (Tris-HCl 0,2 M pH 7, imidazole 10 mM, α -naphthylsulfate 0,2 mg/ml, orthodanisidine tétra-azotée 1 mg/ml) et incubées 15 à 120 min à 25 °C. Après apparition du précipité pourpre résultant du couplage de l'orthodanisidine tétra-azotée avec l' α -naphthol issu de l'hydrolyse enzymatique de l' α -naphthylsulfate, les boîtes sont lavées à l'eau distillée, puis traitées 16 h à l'acide acétique 5 % (v/v) pour fixer la coloration (Ohresser et al. 1997).

9.3.2 Dosage de l'activité arylsulfatase

Les cellules d'une boîte de Pétri ($\sim 4 \times 10^8$ cell) sont reprises dans 2 ml de milieu TAP_N liquide, puis ensemencées à la densité de 6×10^6 cell/ml en tubes en verre de 12 ml contenant 2 ml de milieu liquide approprié. Après 8, 16 ou 24 h de culture en lumière vive sous agitation continue, les cellules sont détruites par transfert des tubes à -20°C . Le lendemain, 100 μl de tampon de réaction (glycine-NaOH 2 M pH 9, imidazole 0,1 M, α -naphtylsulfate 2 mg/ml) sont ajoutés à une aliquote de 50 à 400 μl de suspension décongelée (~ 20 μg de protéines) et le volume est amené à 500 μl . Le mélange est ensuite incubé 30 à 60 min à 37°C , puis la réaction interrompue par addition de 500 μl de solution d'arrêt [NaAc 0,2 M, SDS 4 % (p/v)]. La quantité d' α -naphtol formé au cours de la réaction enzymatique est alors mesurée par spectrophotométrie à 540 nm dans les 2 ou 3 min suivant l'ajout de 100 μl d'orthodiansidine tétra-azotée 10 mg/ml. La courbe étalon est établie avec 5, 10, 20, 25, 30 et 40 nmol d' α -naphtol. Chaque échantillon est accompagné d'un blanc auquel l' α -naphtylsulfate n'est ajouté qu'après l'incubation à 37°C (*adapté de Ohresser et al. 1997*).

9.3.3 Dosage de l'activité NADH:nitrate réductase

Les cellules d'une boîte de Pétri ($\sim 4 \times 10^8$ cell) sont mises en suspension dans 5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, puis centrifugées 5 min à $1200 \times g$ (Universal II, Hettich, Bäch, Suisse) et reprises dans 1 ml de tampon d'extraction froid (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, FAD 20 μM). Après destruction des cellules aux ultrasons (30 sec; Vibra Cell, Sonics and Materials, Newtown, CT, USA), la suspension est centrifugée à froid 10 min à $12000 \times g$ (EBA-12, Hettich) et le surnageant (constituant l'extrait enzymatique) transféré dans un nouveau tube préalablement refroidi sur glace.

Le dosage de l'activité NADH:nitrate réductase (Hageman et Reed 1980) est basé sur la détermination de la quantité de nitrite formé par 100 μl d'extrait enzymatique (~ 500 μg de protéines) en présence de KNO_3 10 mM et de NADH 0,4 mM dans 1 ml de tampon phosphate (K_2HPO_4 - KH_2PO_4 25 mM pH 7,5). Après 15 min d'incubation à 30°C , la réaction est interrompue par 4 min de transfert à 100°C . Le tube est ensuite refroidi 2 min sur glace, puis centrifugé 2 min à $12000 \times g$

avant d'ajouter au surnageant 1 μl de méthosulfate de phénazine 15 mM afin d'oxyder le NADH résiduel. À l'issue de 15 min d'incubation à température ambiante, 500 μl de la réaction sont transférés dans un nouveau tube, mélangés au réactif de Greiss [500 μl de sulfanilamide 0,5 % (p/v) et 250 μl de N-(1-Naphtyl)-éthylènediamine 0,2 % (p/v)] et incubés pendant 30 min à température ambiante. La quantité de nitrite formé au cours de la réaction enzymatique est alors mesurée par spectrophotométrie à 540 nm en utilisant 2,5, 5, 10, 20 et 40 nmol de NaNO_2 pour établir la courbe étalon. Chaque échantillon est accompagné d'un blanc auquel le NADH n'est ajouté qu'après l'incubation à 30°C (Loppes et al. 1999).

9.3.4 Préparation de fractions membranaires brutes

Les cellules de 50 ml de culture en milieu TAP liquide ($\sim 1 \times 10^7$ cell/ml) sont récoltées par 10 min de centrifugation à $700 \times g$ (Sorvall RC-5C Plus, Kendro, Asheville, NC, USA), puis remises en suspension dans 2 à 3 ml de tampon d'extraction (MOPS-KOH ou MET; voir ci-dessous). Après destruction des cellules aux ultrasons (2×30 sec; Vibra Cell, Sonics and Materials, Newtown, CT, USA), les débris de grande taille sont éliminés par deux centrifugations successives à faible vitesse (10 min à $480 \times g$ suivies de 4 min à $3000 \times g$). Le surnageant est ensuite centrifugé à grande vitesse (15 min à $27000 \times g$) et le culot de membranes obtenu mis en suspension dans 200 μl de solution D (immunodétection de l'AOX; voir ci-dessous) ou 600 μl de tampon d'extraction (dosages enzymatiques). Un dernier *pulse* de 2 sec d'ultrasons permet d'homogénéiser la suspension de fractions membranaires brutes.

Les tampons d'extraction (Remacle et al. 2001a) se composent comme suit :

- ▷ immunodétection de l'AOX (voir section 9.3.5) : tampon MOPS-KOH (mannitol 280 mM, MOPS-KOH 10 mM pH 7,4, BSA 0,1 %) et solution D (HEPES 20 mM pH 7,2, mannitol 150 mM, EDTA 8 mM pH 8, MgCl_2 40 mM) ;
- ▷ dosage de l'activité cytochrome *c* oxydase (voir section 9.3.6) : tampon MOPS-KOH ;
- ▷ dosage de l'activité NADH:ubiquinone oxydoréductase (voir section 9.3.7) : tampon MET (mannitol 280 mM, EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7, BSA 0,1 %).

9.3.5 Immunodétection de l'oxydase alternative

Transfert des protéines par Western blotting

Après solubilisation des fractions membranaires brutes dans un volume de tampon de dénaturation [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 10 % (p/v), glycérol 20 % (v/v), bleu de bromophénol 0,1 %] et ébullition pendant 5 min, 30 μ g de protéines sont séparées par migration sur gel de polyacrylamide 12 % selon Laemmli (1970). Le gel est ensuite rincé 15 min dans du tampon de transfert [Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20 % (v/v)], tandis que la membrane Hybond C Super (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) est imbibée pendant 15 sec de méthanol, puis rincée dans l'eau distillée et équilibrée 5 min dans du tampon de transfert. L'électrotransfert (Trans-Blot Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) est réalisé selon les indications du fournisseur. Une différence de potentiel de 30 V est appliqué pendant une nuit à 4 °C. Un marqueur précoloré (Bio-Rad) est utilisé pour estimer les masses moléculaires et l'efficacité du transfert.

Liaison et détection

Ces étapes sont effectuées en suivant les instructions du kit BM Chemiluminescence Western blotting (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Après 16 h de transfert, la membrane est rincée 2 \times dans du TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), incubée 2 h dans la solution de blocage 1 % (préparée dans du TBS) puis 90 min avec la solution d'anticorps primaires (anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'AOX1 de *C. reinhardtii* dilués 54000 \times dans la solution de blocage 0,5 %; don de S. Merchant, Université de Californie, Los Angeles, CA, USA). La membrane est ensuite lavée 2 \times 10 min dans du TBST [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, Tween 20 0,1 % (v/v)], 2 \times 10 min dans la solution de blocage 0,5 %, puis incubée 30 min avec la solution d'anticorps secondaires (anticorps anti-IgG de lapin couplés à une peroxydase et dilués à raison de 0,3 μ l par 5 ml de solution de blocage 0,5 %). Finalement, la membrane est lavée 4 \times 15 min dans du TBST, puis emballée dans un sac en plastique pour la détection avec les réactifs de chimiluminescence. Le sac est ensuite placé dans une cassette en regard d'un film autoradiographique (X-Ray, Fuji, Tokyo, Japon) durant 1 à 15 min. Dans le cas de l'immunodétection de contrôle de la sous-unité III de la cytochrome *c* oxydase (COX3), les anticorps dirigés

contre l'enzyme de *S. cerevisiae* (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) ont été utilisés à la concentration de 1 μ g/ml.

9.3.6 Dosage de l'activité cytochrome *c* oxydase

L'activité cytochrome *c* oxydase est mesurée par spectrophotométrie, en suivant la réoxydation du cytochrome *c* à 550 nm (préalablement réduit à la dithionite dans du MOPS-KOH 10 mM pH 7,4). La réaction est initiée par addition du cytochrome *c* (53 μ M final) aux fractions membranaires brutes (2 μ g de protéines) présentes dans 1 ml de tampon de mesure [MOPS-KOH 10 mM pH 7,4, Triton X-100 1 % (v/v)]. Le coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* utilisé pour le calcul des activités est de 19,6 mM⁻¹ cm⁻¹. L'ajout de KCN (1 mM final), inhibiteur du complexe IV, bloque complètement la réaction (Remacle et al. 2001a).

9.3.7 Dosage de l'activité NADH ubiquinone oxydoréductase

L'activité NADH:ubiquinone oxydoréductase est mesurée par spectrophotométrie, en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm en présence d'un accepteur d'électrons exogène, la duroquinone (Leterme et Boutry 1993). La réaction est initiée par addition d'une aliquote de fractions membranaires brutes (100 à 200 μ g de protéines) dans 1 ml de tampon de mesure (Tris-HCl 20 mM pH 8, NADH 0,1 mM, duroquinone 0,1 mM). Le coefficient d'extinction molaire du NADH utilisé pour le calcul des activités est de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹. L'ajout de roténone (10 μ M final), inhibiteur du complexe I, permet d'évaluer la contribution de l'enzyme à l'oxydation du NADH (Remacle et al. 2001a).

9.3.8 Quantification des protéines

Les concentrations en protéines des suspensions cellulaires, des extraits enzymatiques et des fractions membranaires brutes sont déterminées par le réactif de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), en utilisant 1 à 12 μ g de sérum albumine bovine (BSA) pour la courbe étalon (Bradford 1976).

9.3.9 Mesures de respiration *in vivo*

Les mesures de respiration sont effectuées à l'aide d'un oxygraphe (Hansatech Instruments Ltd,

King's Lynn, UK) composé d'une cellule de mesure et d'une électrode de Clark connectée à un boîtier électronique chargé d'amplifier et de contrôler le signal avant de le transmettre à un enregistreur graphique (Kipp and Zonen, Delft, Pays-Bas).

L'électrode de Clark (ou électrode à oxygène) est constituée d'une anode d'argent et d'une cathode de platine. Celles-ci sont reliées entre elles par un pont à KCl et séparées du milieu de mesure par une membrane en Téflon perméable à l'oxygène. Lorsqu'un faible voltage leur est appliqué (de sorte que le platine soit négatif par rapport à l'argent), le courant est négligeable et le platine adopte le potentiel imposé par le réglage du boîtier de contrôle. Si ce potentiel est supérieur à 600 mV, le platine réduit à grande vitesse l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. L'état d'équilibre étant rapidement atteint, une électrode placée dans un milieu oxygéné à température et pression constantes produira un courant continu (revue par Walker 1987).

La cellule de mesure est une cuvette réactionnelle au volume ajustable (de 1 à 2,5 ml) dont la température est maintenue à 25 °C par circulation d'eau thermostatisée. Elle est munie d'un bouchon à la face interne évidée en cône percé d'un conduit capillaire servant à évacuer les bulles, ainsi qu'à injecter les inhibiteurs au cours de l'expérience.

En pratique, les cellules de 50 ml de culture en milieu TAP liquide ($1 \text{ à } 2 \times 10^7$ cell/ml) sont récoltées par 10 min de centrifugation à $1500 \times g$ (Sorvall RC-5C Plus, Kendro, Asheville, NC, USA), puis reprises en milieu frais à la concentration de 1×10^7 cell/ml et remises à agiter à la lumière pour toute la durée de l'expérience. À chaque mesure, 500 μl de milieu frais sont introduits dans la cuvette et le papier mis à défiler. Une fois le signal stabilisé, 500 μl de cellules sont ajoutées, ce qui se traduit par une chute du tracé de l'oxygraphe, témoignage de la consommation d'oxygène.

Cette première pente représente la respiration totale (V_T). L'addition de cyanure de potassium (KCN, 1 mM final), inhibiteur de la cytochrome *c* oxydase, permet de mesurer la respiration résistante au KCN (V_{KCN}). La respiration résiduelle (V_{res}) est ensuite obtenue par ajout de *n*-propyl gallate (PG, 1 mM final), inhibiteur de l'oxydase alternative. Ces deux inhibiteurs peuvent être introduits en ordre inverse afin de déterminer la respiration résistante au PG (V_{PG}), puis la respiration résiduelle (V_{res} ; Goyal et Tolbert 1989; Weger et Dasgupta 1993).

Après étalonnage de l'électrode de Clark par ajout de dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), un puis-

sant réducteur éliminant tout l'oxygène du milieu, et connaissant la vitesse de défilement du papier, ainsi que la quantité d'oxygène moléculaire dissous dans la cellule de mesure, il est possible de convertir ces pentes en vitesses de respiration absolues à l'aide de la formule suivante :

$$V (\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} 10^{-7} \text{ cell}) = \text{pente} \frac{dvp}{ns} 10^7$$

dans laquelle : pente, pente mesurée ; *d*, concentration en oxygène dissous dans le milieu (253 nmol/ml) ; *v*, volume de la cuvette (ml) ; *p*, vitesse de défilement du papier (cm/min) ; *n*, nombre de cellules dans la cuvette ; *s*, échelle verticale (cm/100 % d'oxygène).

La consommation d'oxygène résistante au PG et inhibée par le KCN ($V_{\text{PG}} - V_{\text{res}}$) correspond à la capacité de la voie des cytochromes. De même, la consommation d'oxygène résistante au KCN et inhibée par le PG ($V_{\text{KCN}} - V_{\text{res}}$) correspond à la capacité de la voie alternative.

9.4 Techniques moléculaires

9.4.1 Extraction d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli*

L'ADN plasmidique de 2 à 5 ml de culture bactérienne ($\sim 1 \times 10^9$ cell/ml) est extrait par lyse alcaline modifiée (Sambrook et al. 1989), puis purifié sur une colonne à base de silice selon les indications du fournisseur (Concert Rapid Plasmid Miniprep System, Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA). Après élimination de l'ARN, des protéines et autres débris cellulaires à l'aide d'un tampon contenant de l'alcool, les plasmides sont élués par le passage d'une solution de faible force ionique. Le rendement est de l'ordre de 15 à 30 μg d'ADN plasmidique.

Sur le même principe, les plasmides de 50 ml de culture bactérienne sont extraits par lyse alcaline modifiée, puis purifiés sur une colonne de silice de type Nucleobond AX (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Le rendement est alors de l'ordre de 100 à 300 μg d'ADN plasmidique.

9.4.2 Extraction d'ADN total de *Chlamydomonas reinhardtii*

À l'exception des matrices de PCR (voir ci-dessous), l'ADN total de *Chlamydomonas reinhardtii* est extrait selon la méthode de Gloeckner (communica-

tion personnelle). Les cellules d'une boîte de Pétri ($\sim 4 \times 10^8$ cell) sont remises en suspension dans 3 ml de TAP liquide et réparties dans deux tubes Eppendorf de 2 ml. Ceux-ci sont centrifugés 5 min à $1200 \times g$ (Universal II, Hettich, Bäch, Suisse) et chaque culot repris dans 700 μ l de tampon CTAB [Tris-HCl 100 mM pH 8, CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8, β -mercaptoéthanol 2% (v/v)]. Après 1 h d'incubation à 65 °C (avec agitation toutes les 20 min) et retour à température ambiante, 700 μ l de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) sont ajoutés. Le mélange est agité au vortex, laissé en contact 15 min, puis centrifugé 5 min à $15000 \times g$ (EBA-12, Hettich). Une fois la phase aqueuse transférée dans un nouveau tube, une seconde extraction est effectuée avec 1 volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et la phase aqueuse à nouveau récupérée. L'ADN est ensuite précipité avec 0,7 volume d'isopropanol, les tubes agités par inversion, placés au moins 15 min sur glace, puis centrifugés 15 min à $15000 \times g$. Les culots sont alors lavés avec 1 ml d'éthanol 70%, séchés 5 min au SpeedVac (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) et dissous dans $2 \times 20 \mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) + RNase (20 μ g/ml). Les solutions sont finalement rassemblées dans un seul tube Eppendorf, puis incubées 30 min à 37 °C pour dégrader les ARNs. Le rendement est de l'ordre de 12 à 20 μ g d'ADN total.

Pour l'amplification par PCR du gène *Aox1*, l'ADN total est extrait à l'aide du kit Nucleon Phytopure (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Les cellules obtenues par raclage de 1/4 de boîte de Pétri ($\sim 1 \times 10^8$ cell) sont mises en suspension dans 500 μ l de milieu M-N liquide, puis centrifugées 2 min à $1500 \times g$ (EBA-12, Hettich). Le culot est ensuite repris dans 600 μ l de solution de lyse (contenant 20 μ g/ml de RNase) et le tube agité vigoureusement, puis incubé 30 min à 37 °C. Après neutralisation, le mélange est incubé 10 min à 65 °C (avec agitation régulière), puis refroidi 20 min sur glace. À ce stade, 500 μ l de chloroforme froid sont ajoutés, suivis de 100 μ l de suspension de résine Nucleon Phytopure et le mélange agité 10 min à température ambiante afin d'éliminer les polysaccharides. Le tube est alors centrifugé 10 min à $1500 \times g$ et le surnageant transféré dans un nouveau tube. Après précipitation à l'isopropanol (voir ci-dessus), l'ADN total est repris dans du TE ou de l'eau distillée. Avec un rendement du même ordre de grandeur que la méthode au CTAB, ce protocole donne un ADN très propre et de très haut poids moléculaire.

Dans le cas de la détection par PCR des zones de jonction des constructions portées par les transformants, une méthode de lyse adaptée aux grandes séries d'échantillons est utilisée (L. Ellis, communication personnelle). Brièvement, 0,5 cm² de cellules ($\sim 5 \times 10^6$ cell) sont mises en suspension dans 100 μ l de tampon PCR contenant 4 mg/ml de protéinase K. Après 1 h d'incubation à 58 °C, l'enzyme est inactivée 1 h à 95 °C, puis les débris cellulaires éliminés par 2 min de centrifugation à $15000 \times g$.

9.4.3 Électrophorèse d'ADN en gel d'agarose

Une aliquote d'ADN ($\sim 0,1 \mu$ g) additionnée de 0,1 volume de tampon de charge [urée 4 M, sucre 50% (p/v), EDTA 10 mM pH 8, bleu de bromophénol 0,1%] est déposée sur un gel d'agarose 0,8 ou 1% (Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA) préparé dans du tampon TEA (Tris-HAc 40 mM pH 8, EDTA 2 mM). Après 1 h de migration dans du tampon TEA sous une différence de potentiel de 80 à 120 V (cuve d'électrophorèse Invitrogen), le gel est coloré 15 min dans un bain de bromure d'éthidium (50 μ g/100 ml). Les photos des bandes d'ADN visibles en fluorescence au transilluminateur UV (312 nm) sont réalisées à l'aide du logiciel Bio-Profil v6.0 (Vilber-Lourmat, Marne-la-Vallée, France), qui permet en outre d'évaluer les tailles des différents fragments en comparaison de marqueurs de poids moléculaire, parmi lesquels l'ADN du phage λ digéré par *Hind* III et les 100 bp ou 1 kb ladders (Invitrogen et MBI Fermentas, Vilnius, Lituanie).

9.4.4 Récupération d'ADN en gel d'agarose

Un bloc d'agarose contenant la bande d'ADN d'intérêt est découpé du gel d'électrophorèse (voir section 9.4.3). L'ADN est ensuite purifié en utilisant le kit Quantum Prep Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) selon les indications du fournisseur. Brièvement, le bloc d'agarose est désagrégé par congélation, puis l'ADN récupéré par filtration en microcentrifugeuse, tandis que les débris d'agarose restent prisonniers du filtre. Il est ensuite possible de reconcentrer le fragment par précipitation à l'éthanol (voir section 9.4.6).

9.4.5 Purification d'ADN

Un volume d'un mélange phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) est ajouté à la réaction de restriction (*voir* section 9.4.7) à purifier et le mélange vigoureusement vortexé pendant 20 sec. Après centrifugation 5 min à $15\,000 \times g$ (EBA-12, Hettich, Bäch, Suisse), les protéines dénaturées par le phénol sont retenues à l'interface entre la phase organique plus dense et la phase aqueuse plus légère. La phase aqueuse est alors précautionneusement récupérée à l'aide d'une pipette dont l'embout a été coupé en biseau afin de réduire les turbulences de l'aspiration, secondant ainsi le rôle anti-moussant de l'alcool isoamylique.

9.4.6 Précipitation d'ADN

Deux méthodes ont été utilisées :

- ▷ La première méthode consiste en l'ajout de 0,1 volume de NaCl 3 M et de 2 volumes d'éthanol absolu froid, suivi de 30 min d'incubation à -80°C . Après 30 min de centrifugation à froid à $15\,000 \times g$ (BEA-12, Hettich, Bäch, Suisse) et élimination du surnageant, le culot est lavé avec $2 \times 500 \mu\text{l}$ d'éthanol 70 % froid (centrifugation 15 min), séché 5 min au SpeedVac (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) ou à l'air, puis repris dans l'eau distillée ou le TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), éventuellement avec RNase ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$).
- ▷ La seconde méthode est basée sur l'utilisation d'un *carrier*, le *seeDNA* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Ainsi, $2 \mu\text{l}$ de *seeDNA* et 0,1 volume de NaAc 3 M pH 5,2 sont mélangés à la solution d'ADN, puis additionnés de 2 volumes d'éthanol absolu. Après une brève agitation au vortex, le tube est incubé 2 min à température ambiante et centrifugé 5 min à $15\,000 \times g$. Le surnageant est alors éliminé, puis après lavage avec $500 \mu\text{l}$ d'éthanol 70 %, le culot est séché 5 min au SpeedVac ou à l'air et repris dans l'eau distillée ou le TE.

9.4.7 Restriction d'ADN

Pour chaque digestion, 5 à 10 unités d'enzyme sont ajoutées par μg d'ADN. La réaction s'effectue durant 2 h à 37°C dans 20 à $200 \mu\text{l}$ du tampon recommandé par les fournisseurs (Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA ou Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne).

9.4.8 Génération d'ADN aux extrémités franches

Dans un tube Eppendorf contenant $2 \mu\text{g}$ d'ADN aux extrémités adhésives dissous dans $40 \mu\text{l}$ d'eau distillée glacée, sont introduits $5 \mu\text{l}$ de tampon $10\times$, $1 \mu\text{l}$ de DTT 250 mM, $2 \mu\text{l}$ de dNTPs (2,5 mM chacun) et 10 unités de T4 DNA polymérase (Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA). Après 20 min d'incubation à 11°C , l'enzyme est inactivée par 10 min de transfert à 75°C et l'ADN récolté par précipitation (*voir* section 9.4.6).

9.4.9 Déphosphorylation d'ADN

Selon un protocole simplifié, 1 unité de CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA) est directement ajoutée au mélange de restriction contenant le vecteur linéaire à déphosphoryler pour éviter sa simple recircularisation. Après 5 min d'incubation à 37°C (pour des extrémités dépassant en 5') ou à 50°C (pour des extrémités dépassant en 3'), l'enzyme est inactivée par 15 min de transfert à 65°C (en présence d'une concentration d'EDTA équimolaire au MgCl_2 du tampon) et/ou éliminée par purification (*voir* section 9.4.5).

9.4.10 Adénylation d'ADN

Dans un tube Eppendorf contenant 50 ng de produit PCR aux extrémités franches dissous dans $7 \mu\text{l}$ d'eau distillée (*voir* section 9.4.12), sont introduits $1 \mu\text{l}$ de tampon PCR $10\times$, $1 \mu\text{l}$ de dATP 2 mM et 5 unités de *Taq* DNA polymérase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Après 30 min d'incubation à 70°C , le mélange est directement utilisé en ligation (*voir* section 9.4.11).

9.4.11 Ligation d'ADN

Que les extrémités des fragments soient franches ou adhésives, un protocole identique est appliqué : $4 \mu\text{l}$ de tampon $5\times$ et 1 unité de T4 DNA ligase (Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA) sont ajoutés à 100 ng d'ADN à ligaturer (rapport molaire insert:vecteur de 3:1) dissous dans $16 \mu\text{l}$ d'eau distillée. Après 16 h d'incubation à 16°C , la ligase est inactivée 10 min à 65°C et le mélange directement utilisé en transformation d'*E. coli* (*voir* section 9.2.1).

Dans le cas du *T/A cloning* à l'aide du kit pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA),

la réaction s'effectue pendant 16 h à 4 °C dans 10 μ l de tampon contenant le produit PCR adénylé à cloner (voir section 9.4.10), 50 ng de vecteur pGEM-T Easy (rapport molaire insert:vecteur de 3:1) et 3 unités de T4 DNA ligase.

9.4.12 Amplification d'ADN par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) se compose d'une trentaine de cycles au cours desquels trois gammes de température conditionnent trois étapes distinctes :

- ▷ (± 94 °C) **dénaturation** : les brins de la double hélice d'ADN se séparent à la suite de la rupture des liaisons hydrogène qui les maintiennent assemblés en temps normal ;
- ▷ (± 55 °C) **hybridation** : deux amorces s'associent aux brins monocaténaires au niveau de régions qui leur sont complémentaires ;
- ▷ (± 72 °C) **élongation** : en partant des amorces, une DNA polymérase thermostable synthétise les brins complémentaires aux matrices par addition successive de nucléotides.

À l'issue de chaque cycle, la quantité d'ADN en solution est théoriquement doublée, mais en pratique, l'amplification n'est pas tout à fait exponentielle. Cela est notamment causé par l'épuisement progressif de l'un ou l'autre des réactifs et par la perte d'activité de la polymérase à la suite des changements cycliques de température.

La matrice est introduite sous forme de plasmide purifié (voir section 9.4.1), d'ADN génomique de *C. reinhardtii* (brut ou purifié ; voir section 9.4.2) ou encore de cellules bactériennes prélevées à l'aide d'un cure-dent stérile (Gussow et Clackson 1989). Afin de contrôler l'absence de contamination, un témoin négatif sans matrice est inclus dans chaque série, tandis qu'un témoin positif porteur de la région à amplifier est ajouté aux échantillons lors des PCRs de criblage sur bactéries ou d'évaluation du pourcentage de co-transformation chez *C. reinhardtii*.

Généralement, le mélange réactionnel contient 0,2 μ M de chaque amorce, 0,2 mM de dNTPs et 2 unités de *Taq* DNA polymérase (Qiagen, Hilden, Allemagne ou Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA ou Promega, Madison, WI, USA) dans 20 à 50 μ l de tampon adéquat (contenant du $MgCl_2$ 1,5 mM) pour 5 à 50 ng de matrice d'ADN. Lorsque l'amplification est difficile (par exemple, dans le cas des lyses), il est possible d'améliorer le rendement par addition de DMSO 6 %, dont l'effet supposé est de faciliter le déroulement de la double hélice.

En vue d'optimiser la sélectivité de l'amplification et de prolonger la durée de vie de la polymérase, tous nos programmes (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) comptent deux séries de cycles composés comme suit : 3 à 10 min de dénaturation initiale à 94 °C ; 10 \times (45 sec de dénaturation à 94 °C, 45 sec d'hybridation à une température 2 à 3 °C inférieure au T_m des amorces, 45 à 90 sec d'élongation à 72 °C en fonction de la longueur de l'amplicon) ; 25 \times (45 sec à 90 °C, 45 sec à une température 7 à 8 °C inférieure au T_m des amorces, 45 à 90 sec à 72 °C) ; 7 min d'élongation finale à 72 °C. Dans le cas des lyses, un *hot start* est simulé en ne plaçant les tubes dans le *thermocycler* qu'une fois la température de dénaturation atteinte.

L'amplification d'un fragment d'ADN aussi long que le gène *Aox1* nécessite une optimisation minutieuse des conditions de PCR. Le mélange réactionnel contient 0,3 μ M de chacune des longues amorces (30 et 34 nt ; voir chapitre 8, Tableau 8.3), 0,2 mM de dNTPs, de la solution Q 1 \times (Qiagen), du DMSO 6 % et 4 unités de Super *Taq* Plus DNA polymérase (HT Biotechnology, Cambridge, UK) dans 50 μ l de tampon adéquat ($MgCl_2$ 1,5 mM) pour 2 μ g d'ADN total de *C. reinhardtii* extrait avec le kit Nucleon (voir section 9.4.2). Le programme est le suivant : 6 min à 94 °C (*hot start*), 10 \times (20 sec à 92 °C, 1 min à 62 °C, 4 min à 68 °C) ; 25 \times (20 sec à 90 °C, 1 min à 57 °C, 4 min à 68 °C) ; le temps d'élongation est allongé de 10 sec à chacun des 25 derniers cycles ; 7 min d'élongation finale à 68 °C.

9.4.13 Séquençage d'ADN

La plupart des réactions de séquence ont été réalisées par Genome Express (Paris, France), à l'exception de quelques-unes effectuées manuellement selon le protocole décrit ci-dessous.

La majorité des analyses bioinformatiques ont été réalisées avec le GCG Wisconsin Package 10.3 (Accelrys, San Diego, CA, USA) disponibles *via* le Belgian EMBnet Node¹ (BEN, Université Libre de Bruxelles, Belgique). Quelques analyses complémentaires ont été effectuées en recourant aux services en ligne du BCM Search Launcher² et du Pôle Bio-Informatique Lyonnais³ (PBIL, France).

1. <http://ben.vub.ac.be/>

2. <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

3. <http://pbil.univ-lyon1.fr/>

Réactions de séquence

La méthode de séquençage est basée sur l'utilisation de didésoxynucléotides (ddNTPs) dépourvus du groupement 3'-OH des désoxynucléotides (dNTPs) correspondants (Sanger et al. 1977). L'incorporation au hasard d'un ddNTP dans une chaîne d'ADN en cours d'élongation se traduit par un arrêt de la synthèse. Les réactions de séquençage ont été réalisées à l'aide du kit T7 Sequencing (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), conformément aux indications du fournisseur. Après dénaturation du plasmide à séquencer, l'amorce est hybridée à la matrice dans un tampon TDMN (TES 280 mM, HCl 120 mM, DTT 50 mM, MgCl₂ 80 mM, NaCl 0,2 M; Del Sal et al. 1989). La synthèse d'ADN est ensuite initiée 2 à 3 min par la T7 DNA polymérase en présence de dCTP, dGTP, dTTP et d' α -³⁵S-dATP. Quatre aliquotes de la réaction de marquage sont alors transférées dans quatre mélanges de terminaison (contenant chacun les quatre dNTPs, ainsi que l'un des quatre ddNTPs), puis les tubes incubés 15 min à 37°C. La réaction est finalement interrompue par addition d'une solution d'arrêt qui fera aussi office de tampon de charge (formamide désionisée 97,5%, EDTA 10 mM pH 7,5, bleu de bromophénol 0,3%, xylène cyanol 0,3%).

Électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant

Les échantillons, dénaturés 3 min à 85°C et refroidis quelques secondes sur glace, sont déposés sur un gel de polyacrylamide 6% dénaturant (urée 8 M). La migration s'effectue dans du tampon TBE (Tris 90 mM, H₃BO₃ 90 mM, EDTA 2,5 mM pH 8) à voltage constant (de 1800 à 2000 V) dans un appareil Sequi-Gen Sequencing Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Après 2 h d'électrophorèse, le gel est séché sous vide à 80°C durant 1 à 2 h, puis exposé quelques jours en regard d'un film d'autoradiographie (X-Ray, Fuji, Tokyo, Japon).

9.4.14 Hybridation d'ADN sur Southern blot

Transfert d'ADN par Southern blotting

Environ 5 à 10 μ g d'ADN total de *C. reinhardtii* digéré par *Hinf*I, de même que les marqueurs de poids moléculaire λ /*Hind*III et 100 bp ladder, sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 0,8%

(voir sections 9.4.2, 9.4.3 et 9.4.7). Après 10 min d'exposition aux UV afin de fragmenter l'ADN de haut poids moléculaire, le gel est placé dans un système de transfert par le vide (Vacugene 2016, LKB Bromma, Bromma, Suède), sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) préalablement traitée 5 min au SSC 2 \times (SSC 20 \times : NaCl 3 M, NaCitrate dihydraté 0,3 M, pH 7). À partir de cet instant, un vide partiel de 50 à 60 mbar est appliqué pendant toute l'opération. Les ADN subissent d'abord 30 min de dénaturation (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M), puis 30 min de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 3 M) et sont ensuite transférés sur la membrane durant 2 h avec du SSC 20 \times . Cette dernière est finalement rincée 2 min dans du SSC 2 \times avant d'y fixer les ADN par 30 min d'incubation sous vide à 120°C.

Préparation et marquage radioactif de la sonde

Le plasmide contenant le promoteur *Aox1* cloné (voir chapitre 5, section 5.1.2) est extrait d'*Escherichia coli*, puis digéré par *Sal*I afin de libérer un fragment de 1219 pb. Après électrophorèse préparative sur gel d'agarose 0,8%, le fragment d'ADN est récupéré (voir sections 9.4.1, 9.4.3, 9.4.4 et 9.4.7) et marqué radioactivement à l' α -³²P-dCTP à l'aide du kit RadPrime DNA Labeling System (Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, USA). En pratique, 25 ng d'ADN dissous dans 21 μ l d'eau distillée sont dénaturés 5 min à 100°C et le tube immédiatement ramené sur glace avant d'ajouter 1 μ l de dATP 0,5 mM, 1 μ l de dGTP 0,5 mM, 1 μ l de dTTP 0,5 mM, 20 μ l de solution d'amorces aléatoires 2,5 \times et 5 μ l d' α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Après addition de 1 μ l de fragment de Klenow (40 unités/ μ l), le mélange est incubé 10 min à 37°C, puis 5 μ l de solution d'arrêt sont ajoutés pour interrompre la réaction. Une fois marquée, la sonde est purifiée sur une mini Quick Spin Column (Boehringer, Ingelheim, Allemagne) préalablement centrifugée 1 min à 1000 \times g (EBA-12, Hettich, Bäch, Suisse). L'échantillon est déposé au sommet de la colonne, elle-même placée dans un tube Eppendorf destiné à récupérer le filtrat après 4 min de centrifugation à 1000 \times g. L'activité spécifique de la sonde est mesurée au compteur à scintillation (LS 5000 CE, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Cette méthode permet d'atteindre des activités de l'ordre de 2 à 4 \times 10⁹ CPM/ μ g d'ADN.

Hybridation et détection

La membrane est placée dans un cylindre à hybrider contenant 15 ml de solution d'hybridation [$6\times$ SSC, $5\times$ Denhardt's ($100\times$ Denhardt's: BSA 2%, Ficoll 2%, PVP 2%), SDS 0,5%, 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN de sperme de hareng dénaturé]. À l'issue de 3 h de préhybridation à 68 °C (HB-1D Hybridizer, Techne, Cambridge, UK), la membrane est hybridée 16 h à 68 °C dans 15 ml de solution d'hybridation fraîche à laquelle est ajoutée la sonde marquée (au minimum 1×10^5 CPM/cm² de membrane), préalablement dénaturée 10 min à 100 °C et refroidie sur glace. Après 2×10 min de lavage dans du SSC $2\times$ -SDS 0,1 % à température ambiante, la membrane est lavée 2×10 min dans du SSC $1\times$ -SDS 0,1 % à 68 °C, puis 15 min dans du SSC $0,1\times$ -SDS 0,1 % à 68 °C et enfin 5 min dans du SSC $2\times$ à température ambiante. Elle est ensuite scellée dans un sac en plastique et mise en cassette en regard d'un écran de PhosphorImager (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Quelques heures plus tard, l'écran est révélé au PhosphorImager (Storm 820, Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) sous le contrôle du logiciel ImageQuant 5.0.

Cinquième partie

Bibliographie

Bibliographie

- M. Adam and R. Loppes. Use of the *ARG7* gene as an insertional mutagen to clone *PHON24*, a gene required for derepressible neutral phosphatase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*, 258: 123–132, 1998.
- C. Affourtit, M. S. Albury, P. G. Crichton, and A. L. Moore. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett*, 510: 121–126, 2002.
- C. Affourtit, K. Krab, and A. L. Moore. Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*, 1504:58–69, 2001.
- W. U. Ajayi, M. Chaudhuri, and G. C. Hill. Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase. *J Biol Chem*, 277:8187–8193, 2002.
- M. S. Albury, C. Affourtit, P. G. Crichton, and A. L. Moore. Structure of the plant alternative oxidase. Site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology. *J Biol Chem*, 277:1190–1194, 2002.
- M. S. Albury, C. Affourtit, and A. L. Moore. A highly conserved glutamate residue (Glu-270) is essential for plant alternative oxidase activity. *J Biol Chem*, 273:30301–30305, 1998.
- M. S. Albury, P. Dudley, F. Z. Watts, and A. L. Moore. Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide-insensitive respiration. *J Biol Chem*, 271: 17062–17066, 1996.
- N. J. Alexander, N. W. Gillham, and J. E. Boynton. The mitochondrial genome of *Chlamydomonas*. Induction of minute colony mutations by acriflavin and their inheritance. *Mol Gen Genet*, 130:275–290, 1974.
- M. E. Andersson and P. Nordlund. A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett*, 449:17–22, 1999.
- J. T. Bahr and J. Bonner, W. D. Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. *J Biol Chem*, 248:3441–3445, 1973a.
- J. T. Bahr and J. Bonner, W. D. Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway. *J Biol Chem*, 248:3446–3450, 1973b.
- R. J. Bandziulis and J. L. Rosenbaum. Novel control elements in the α_1 -tubulin gene promoter from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*, 214:204–212, 1988.
- J. Banerji, S. Rusconi, and W. Schaffner. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27:299–308, 1981.
- D. Baurain. *Inhibition de l'oxydase alternative de Chlamydomonas reinhardtii par un ARN antisens*. Mémoire de licence, Université de Liège, 1997.
- M. V. Beligni and L. Lamattina. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ*, 24:267–278, 2001.
- D. A. Berthold. Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol:oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1364:73–83, 1998.
- D. A. Berthold, M. E. Andersson, and P. Nordlund. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1460:241–254, 2000.
- D. A. Berthold and J. N. Siedow. Partial purification of the cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) mitochondria. *Plant Physiol*, 101:113–119, 1993.

- H. Bertrand, C. A. Argan, and N. A. Szakacs. Genetic control of the biogenesis of cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. In R. J. Schweyen, K. Wolf, and F. Kaudewitz, editors, *Mitochondria. Nucleo-mitochondrial Interactions*, pages 495–507. Walter de Gruyter and Co., Berlin, Germany, 1983.
- J. E. Blankenship and K. L. Kindle. Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*: a *cabII-1/nit1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1-nit2*-strain. *Mol Cell Biol*, 12:5268–5279, 1992.
- A. J. Bloom, R. M. Caldwell, J. Finazzo, R. L. Warner, and J. Weissbart. Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. *Plant Physiol*, 91:352–356, 1989.
- J. Bonner, W. D., S. D. Clarke, and P. R. Rich. Partial purification and characterization of the quinol oxidase activity of *Arum maculatum* mitochondria. *Plant Physiol*, 80:838–842, 1986.
- J. E. Bourque. Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci*, 105:125–149, 1995.
- M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- K. J. Brunke, J. G. Anthony, E. J. Sternberg, and D. P. Weeks. Repeated consensus sequence and pseudopromoters in the four coordinately regulated tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol*, 4:1115–1124, 1984.
- A. C. Cannons and S. D. Shiflett. Transcriptional regulation of the nitrate reductase gene in *Chlorella vulgaris*: identification of regulatory elements controlling expression. *Curr Genet*, 40:128–135, 2001.
- P. Cardol, R. F. Matagne, and C. Remacle. Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J Mol Biol*, 319:1211–1221, 2002.
- P. Carol, D. Stevenson, C. Bisanz, J. Breitenbach, G. Sandmann, R. Mache, G. Coupland, and M. Kuntz. Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 11:57–68, 1999.
- M. Chaudhuri, W. Ajayi, and G. C. Hill. Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol Biochem Parasitol*, 95:53–68, 1998.
- H. Chen, P. A. Romo-Leroux, and M. L. Salin. The iron-containing superoxide dismutase-encoding gene from *Chlamydomonas reinhardtii* obtained by direct and inverse PCR. *Gene*, 168:113–116, 1996.
- M. Colin, M. P. Dorthu, F. Duby, C. Remacle, M. Dinant, M. R. Wolwertz, C. Duyckaerts, F. Sluse, and R. F. Matagne. Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome *b* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*, 249:179–184, 1995.
- M. J. Considine, D. O. Daley, and J. Whelan. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiol*, 126:1619–1629, 2001.
- M. J. Considine, R. C. Holtzapffel, D. A. Day, J. Whelan, and A. H. Millar. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol*, 129:949–953, 2002.
- L. Cournac, E. M. Josse, T. Joet, D. Rumeau, K. Redding, M. Kuntz, and G. Peltier. Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355:1447–1454, 2000a.
- L. Cournac, G. Latouche, Z. Cerovic, K. Redding, J. Ravenel, and G. Peltier. In vivo interactions between photosynthesis, mitorespiration, and chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 129:1921–1928, 2002.
- L. Cournac, K. Redding, J. Ravenel, D. Rumeau, E. M. Josse, M. Kuntz, and G. Peltier. Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem*, 275:17256–17262, 2000b.
- R. Cowan. Expected frequencies of DNA patterns using Whittle's formula. *J Appl Prob*, 28:886–892, 1991.
- A. Cruz-Hernandez and M. A. Gomez-Lim. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta*, 197:569–576, 1995.

- J. P. Davies and A. Grossman. The use of *Chlamydomonas* (Chlorophyta: Volvocales) as a model algal system for genome studies and the elucidation of photosynthetic processes. *J Phycol*, 34:907–917, 1998.
- J. P. Davies and A. R. Grossman. Sequences controlling transcription of the *Chlamydomonas reinhardtii* β_2 -tubulin gene after deflagellation and during the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 14:5165–5174, 1994.
- J. P. Davies, D. P. Weeks, and A. R. Grossman. Expression of the arylsulfatase gene from the β_2 -tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res*, 20:2959–2965, 1992.
- D. A. Day, K. Krab, H. Lambers, A. L. Moore, J. N. Siedow, A. M. Wagner, and J. T. Wiskich. The cyanide-resistant oxidase: to inhibit or not to inhibit, that is the question. *Plant Physiol*, 110:1–2, 1996.
- D. A. Day, A. H. Millar, J. T. Wiskich, and J. Whelan. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. *Plant Physiol*, 106:1421–1427, 1994.
- D. A. Day, J. Whelan, A. H. Millar, J. N. Siedow, and J. T. Wiskich. Regulation of the alternative oxidase in plants and fungi. *Aust J Plant Physiol*, 22:497–509, 1995.
- D. A. Day and J. T. Wiskich. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J Bioenerg Biomembr*, 27:379–385, 1995.
- E. L. de Hostos, J. Schilling, and A. R. Grossman. Structure and expression of the gene encoding the periplasmic arylsulfatase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*, 218:229–239, 1989.
- E. L. de Hostos, R. K. Togasaki, and A. Grossman. Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol*, 106:29–37, 1988.
- A. de la Torre, B. Delgado, and C. Lara. Nitrate-dependent O_2 evolution in intact leaves. *Plant Physiol*, 96:898–901, 1991.
- R. Debuchy, S. Purton, and J. D. Rochaix. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *Embo J*, 8:2803–2809, 1989.
- G. Del Sal, G. Manfioletti, and C. Schneider. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*, 7:514–520, 1989.
- T. L. M. Derzaph and H. G. Weger. Immunological identification of the alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J Phycol*, 32:621–623, 1996.
- D. R. Diener, A. M. Curry, K. A. Johnson, B. D. Williams, P. A. Lefebvre, K. L. Kindle, and J. L. Rosenbaum. Rescue of a paralyzed-flagella mutant of *Chlamydomonas* by transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:5739–5743, 1990.
- M. Dinant, D. Baurain, N. Coosemans, B. Joris, and R. F. Matagne. Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, 39:101–108, 2001.
- M. Dinant, D. Baurain, and R. F. Matagne. Characterization of a cDNA encoding the mitochondrial alternative oxidase (AOX) in *Chlamydomonas reinhardtii* and assays of AOX inactivation by the antisense strategy. In I. M. Moller, P. Gardestrom, K. Glimelius, and E. Glaser, editors, *Plant Mitochondria: From Gene to Function*, pages 441–444. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 1998.
- I. Djajanegara, P. M. Finnegan, C. Mathieu, T. McCabe, J. Whelan, and D. A. Day. Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Mol Biol*, 50:735–742, 2002.
- I. Djajanegara, R. Holtzapffel, P. M. Finnegan, M. H. Hoefnagel, D. A. Berthold, J. T. Wiskich, and D. A. Day. A single amino acid change in the plant alternative oxidase alters the specificity of organic acid activation. *FEBS Lett*, 454:220–224, 1999.
- M. P. Dorthu, S. Remy, M. R. Michel-Wolwertz, L. Colleaux, D. Breyer, M. C. Beckers, S. Englebert, C. Duyckaerts, F. E. Sluse, and R. F. Matagne. Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*, 18:759–772, 1992.
- I. B. Dry, A. L. Moore, D. A. Day, and J. T. Wiskich. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. *Arch Biochem Biophys*, 273:148–157, 1989.

- F. Duby and R. F. Matagne. Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nd4*, and the 3'-end of *nd5*. *Plant Cell*, 11:115–125, 1999.
- E. Ducos, P. Touzet, and M. Boutry. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *Plant J*, 26:171–180, 2001.
- T. E. Elthon and L. McIntosh. Characterization and solubilization of the alternative oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. *Plant Physiol*, 82:1–6, 1986.
- T. E. Elthon and L. McIntosh. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:8399–8403, 1987.
- T. E. Elthon, R. Nickels, and L. McIntosh. Mitochondrial events during development of thermogenesis in *Sauromatum guttatum* (Schott). *Planta*, 180:82–89, 1989a.
- T. E. Elthon, R. Nickels, and L. McIntosh. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol*, 89:1311–1317, 1989b.
- T. Endo and K. Asada. Dark induction of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence by acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*, 37:551–555, 1996.
- S. A. Felitti, R. L. Chan, M. G. Sierra, and D. H. Gonzalez. The cytochrome *c* gene from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Structure and expression in wild-type cells and in obligate photoautotrophic (dk) mutants. *Plant Cell Physiol*, 41:1149–1156, 2000.
- E. Fernandez, A. Galvan, and A. Quesada. Nitrogen assimilation and its regulation. In J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, editors, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Advances in Photosynthesis, pages 637–659. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- E. Fernandez, R. Schnell, L. P. Ranum, S. C. Hussey, C. D. Silflow, and P. A. Lefebvre. Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86:6449–6453, 1989.
- J. P. Fett and J. R. Coleman. Regulation of periplasmic carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate and pH. *Plant Physiol*, 106:103–108, 1994.
- P. M. Finnegan, J. Whelan, A. H. Millar, Q. Zhang, M. K. Smith, J. T. Wiskich, and D. A. Day. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiol*, 114:455–466, 1997.
- P. M. Finnegan, A. R. Wooding, and D. A. Day. An alternative oxidase monoclonal antibody recognises a highly conserved sequence among alternative oxidase subunits. *FEBS Lett*, 447:21–24, 1999.
- P. Fischer and U. Klein. Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 88:947–952, 1988.
- M. Fuhrmann, W. Oertel, and P. Hegemann. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 19:353–361, 1999.
- M. Fuhrmann, A. Stahlberg, E. Govorunova, S. Rank, and P. Hegemann. The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci*, 114:3857–3863, 2001.
- A. Galvan, J. Cardenas, and E. Fernandez. Nitrate reductase regulates expression of nitrite uptake and nitrite reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 98:422–426, 1992.
- A. Galvan and E. Fernandez. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell Mol Life Sci*, 58:225–233, 2001.
- A. Galvan, A. Quesada, and E. Fernandez. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 271:2088–2092, 1996.
- M. L. Genevois. Sur la fermentation et sur la respiration chez les végétaux chlorophylliens. *Revue Générale de Botanique*, 41:252–271, 1929.
- M. Goldschmidt-Clermont and M. Rahire. Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Mol Biol*, 191:421–432, 1986.

- M. A. Gonzalez-Meler, L. Giles, R. B. Thomas, and J. N. Siedow. Metabolic regulation of leaf respiration and alternative pathway activity in response to phosphate supply. *Plant Cell Environ*, 24:205–215, 2001.
- M. A. Gonzalez-Meler, M. Ribas-Carbo, L. Giles, and J. N. Siedow. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol*, 120:765–772, 1999.
- D. S. Gorman and R. P. Levine. Cytochrome *f* and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 54:1665–1669, 1965.
- A. Goyal and N. E. Tolbert. Variations in the alternative oxidase in *Chlamydomonas* grown in air or high CO₂. *Plant Physiol*, 89:958–962, 1989.
- A. R. Grossman. *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to genomics. *Curr Opin Plant Biol*, 3:132–137, 2000.
- M. G. Guerrero and M. Gutierrez. Purification and properties of the NAD(P)H:nitrate reductase of the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Biochim Biophys Acta*, 482:272–285, 1977.
- D. Gussow and T. Clackson. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 17:4000, 1989.
- R. H. Hageman and A. J. Reed. Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol*, 69:270–280, 1980.
- D. Hahn, C. Kaltenbach, and U. Kuck. The Calvin cycle enzyme sedoheptulose-1,7-bisphosphatase is encoded by a light-regulated gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*, 36:929–934, 1998.
- D. Hahn and U. Kuck. Identification of DNA sequences controlling light- and chloroplast-dependent expression of the *lhcb1* gene from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, 34:459–466, 1999.
- E. H. Harris. *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1989.
- E. H. Harris. Introduction to *Chlamydomonas*. In J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, editors, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Advances in Photosynthesis, pages 1–11. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- M. Hilal, A. M. Zenoff, G. Ponessa, H. Moreno, and E. M. Massa. Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. *Plant Physiol*, 117:695–701, 1998.
- S. A. Hill. Carbon metabolism in mitochondria. In D. T. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre, and D. B. Layzell, editors, *Plant Metabolism*, pages 181–199. Addison Wesley Longman, Harlow, UK, 2 edition, 1997.
- C. Hiser, P. Kapranov, and L. McIntosh. Genetic modification of respiratory capacity in potato. *Plant Physiol*, 110:277–286, 1996.
- C. Hiser and L. McIntosh. Alternative oxidase of potato is an integral membrane protein synthesized de novo during aging of tuber slices. *Plant Physiol*, 93:312–318, 1990.
- M. H. Hoefnagel, P. R. Rich, Q. Zhang, and J. T. Wiskich. Substrate kinetics of the plant mitochondrial alternative oxidase and the effects of pyruvate. *Plant Physiol*, 115:1145–1153, 1997.
- W. K. Huh and S. O. Kang. Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 181:4098–4102, 1999.
- W. K. Huh and S. O. Kang. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J*, 356:595–604, 2001.
- S. Huq and J. M. Palmer. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Lett*, 95:217–220, 1978.
- D. W. Husic and N. E. Tolbert. Inhibition of glycolate and D-lactate metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deficient in mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:1555–1559, 1987.
- S. H. Hutner, L. Provasoli, A. Schatz, and C. P. Haskins. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc Am Phil Soc*, 94:152–170, 1950.
- H. Inoue, H. Nojima, and H. Okayama. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96:23–28, 1990.

- Y. Ito, D. Saisho, M. Nakazono, N. Tsutsumi, and A. Hirai. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene*, 203:121–129, 1997.
- S. Jacobshagen, K. L. Kindle, and C. H. Johnson. Transcription of *CABII* is regulated by the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*, 31:1173–1184, 1996.
- W. Jarmuszkiewicz, A. M. Wagner, M. J. Wagner, and L. Hryniewiecka. Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett*, 411:110–114, 1997.
- T. Joseph-Horne, J. Babij, P. M. Wood, D. Hollomon, and R. B. Sessions. New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Lett*, 481:141–146, 2000.
- T. Joseph-Horne, D. W. Hollomon, and P. M. Wood. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta*, 1504:179–195, 2001.
- T. Joseph-Horne, P. M. Wood, C. K. Wood, A. L. Moore, J. Headrick, and D. Hollomon. Characterization of a split respiratory pathway in the wheat "take-all" fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Biol Chem*, 273:11127–11133, 1998.
- E. M. Josse, A. J. Simkin, J. Gaffe, A. M. Laboure, M. Kuntz, and P. Carol. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol*, 123:1427–1436, 2000.
- H. Kano and K. Kumazawa. Studies on CN-insensitive respiration in plant roots III. Induction of CN-insensitive respiration with low concentrations of respiratory inhibitors. *Plant Cell Physiol*, 13:237–244, 1972.
- K. L. Kindle. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:1228–1232, 1990.
- K. L. Kindle. Nuclear transformation: technology and applications. In J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, editors, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Advances in Photosynthesis, pages 41–61. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- K. Kirimura, M. Yoda, and S. Usami. Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. *Curr Genet*, 34:472–477, 1999.
- A. Kleinhofs, R. L. Warner, and J. M. Melzer. Genetics and molecular biology of higher plant nitrate reductases. In J. E. Poulton, J. T. Romeo, and E. E. Conn, editors, *Plant Nitrogen Metabolism*, Recent Advances in Phytochemistry, pages 117–155. Plenum Press, New York, NY, USA, 1989.
- K. Krab. Kinetic and regulatory aspects of the function of the alternative oxidase in plant respiration. *J Bioenerg Biomembr*, 27:387–396, 1995.
- J. Kropat, E. D. von Gromoff, F. W. Muller, and C. F. Beck. Heat shock and light activation of a *Chlamydomonas HSP70* gene are mediated by independent regulatory pathways. *Mol Gen Genet*, 248:727–734, 1995.
- K. Kucho, K. Ohyama, and H. Fukuzawa. CO₂-responsive transcriptional regulation of *CAH1* encoding carbonic anhydrase is mediated by enhancer and silencer regions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 121:1329–1337, 1999.
- A. G. J. Kuipers, A. Jacobsen, and R. G. F. Visser. Applications of antisense technology in plants. In C. Lichtenstein and W. Nellen, editors, *Antisense Technology. A Practical Approach*, The Practical Approach Series, pages 191–219. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 1997.
- A. M. Kumar and D. Soll. *Arabidopsis* alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:10842–10846, 1992.
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- H. Lambers. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiol Plant*, 55:478–485, 1982.
- H. Lambers. Oxidation of mitochondrial NADH and the synthesis of ATP. In D. T. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre, and D. B. Layzell, editors, *Plant Metabolism*, pages 200–219. Addison Wesley Longman, Harlow, UK, 2 edition, 1997.

- A. M. Lambowitz, J. R. Sabourin, H. Bertrand, R. Nickels, and L. McIntosh. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol*, 9:1362–1364, 1989.
- C. Lance. La respiration de l'*Arum maculatum* au cours du développement de l'inflorescence. *Annales des Sciences Naturelles Botaniques*, 12:477–495, 1972.
- M. Larsson, B. Ingermarson, and C. M. Larson. Photosynthetic energy supply for NO_3^- assimilation in *Scenedesmus*. *Physiol Plant*, 55:301–308, 1982.
- U. Leisinger, K. Rufenacht, B. Fischer, M. Pesaro, A. Spengler, A. J. Zehnder, and R. I. Eggen. The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Mol Biol*, 46:395–408, 2001.
- S. Lemaire, E. Keryer, M. Stein, I. Schepens, E. Issakidis-Bourguet, G. r.-H. C, M. Miginiac-Maslow, and J. P. Jacquot. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 120:773–778, 1999.
- A. M. Lennon, U. H. Neuenschwander, M. Ribas-Carbo, L. Giles, J. A. Ryals, and J. N. Siedow. The effects of salicylic acid and tobacco mosaic virus infection on the alternative oxidase of tobacco. *Plant Physiol*, 115:783–791, 1997.
- S. Leterme and M. Boutry. Purification and preliminary characterization of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone reductase) from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol*, 102:435–443, 1993.
- J. Li and M. P. Timko. The *pc-1* phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* results from a deletion mutation in the nuclear gene for NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Plant Mol Biol*, 30:15–37, 1996.
- Q. Li, R. G. Ritzel, L. L. McLean, L. McIntosh, T. Ko, H. Bertrand, and F. E. Nargang. Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 142:129–140, 1996.
- T. Lien, O. Schreiner, and M. Steine. Purification of a derepressible arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Properties of the enzyme in intact cells and in purified state. *Biochim Biophys Acta*, 384:168–179, 1975.
- A. Llamas, M. I. Igeno, A. Galvan, and E. Fernandez. Nitrate signalling on the nitrate reductase gene promoter depends directly on the activity of the nitrate transport systems in *Chlamydomonas*. *Plant J*, 30:261–271, 2002.
- R. Loppes and M. Radoux. Identification of short promoter regions involved in the transcriptional expression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*, 45:215–227, 2001.
- R. Loppes and M. Radoux. Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics* (in press), 2002.
- R. Loppes, M. Radoux, M. C. Ohresser, and R. F. Matagne. Transcriptional regulation of the *Nia1* gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the *Nia1* promoter. *Plant Mol Biol*, 41:701–711, 1999.
- V. Lumbreras, D. R. Stevens, and S. Purton. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J*, 14:441–447, 1998.
- S. Mackenzie and L. McIntosh. Higher plant mitochondria. *Plant Cell*, 11:571–585, 1999.
- W. Mages, B. Cresnar, J. F. Harper, M. Bruderlein, and R. Schmitt. *Volvox carteri* α_2 - and β_2 -tubulin-encoding genes: regulatory signals and transcription. *Gene*, 160:47–54, 1995.
- A. J. Marquez, F. Galvan, and J. M. Vega. Purification and characterization of the NADH-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci Lett*, 34:305–314, 1984.
- A. J. Marquez, C. Gotor, L. C. Romero, F. Galvan, and J. M. Vega. Ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Prosthetic groups and preliminary studies of mechanism. *Int J Biochem*, 18: 531–535, 1986.
- R. F. Matagne, M. R. Michel-Wolwertz, C. Munaut, C. Duyckaerts, and F. Sluse. Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol*, 108:1221–1226, 1989.

- R. F. Matagne and C. Remacle. The genetics and molecular biology of mitochondria in *Chlamydomonas*. *Recent Res Devel Plant Biol*, 2:15–32, 2002.
- R. F. Matagne, C. Remacle, and M. Dinant. Cytoconduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:7447–7450, 1991.
- R. F. Matagne, D. Rongvaux, and R. Loppes. Transmission of mitochondrial DNA in crosses involving diploid gametes homozygous or heterozygous for the mating-type locus in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet*, 214:257–262, 1988.
- J. E. Maul, J. W. Lilly, L. Cui, C. W. DePamphilis, W. Miller, E. H. Harris, and D. B. Stern. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell*, 14:2659–2679, 2002.
- D. P. Maxwell, R. Nickels, and L. McIntosh. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J*, 29:269–279, 2002.
- D. P. Maxwell, Y. Wang, and L. McIntosh. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:8271–8276, 1999.
- T. C. McCabe, P. M. Finnegan, A. Harvey Millar, D. A. Day, and J. Whelan. Differential expression of alternative oxidase genes in soybean cotyledons during postgerminative development. *Plant Physiol*, 118:675–682, 1998.
- L. McIntosh. Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol*, 105:781–786, 1994.
- L. McIntosh, T. Eichler, G. Gray, D. P. Maxwell, R. Nickels, and Y. Wang. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1365:278–284, 1998.
- B. J. D. Meeuse. Thermogenic respiration in Aroids. *Annu Rev Plant Physiol*, 26:117–126, 1975.
- M. Michea-Hamzehpour and G. Turian. GMP-stimulation of the cyanide-insensitive mitochondrial respiration in heat-shocked conidia of *Neurospora crassa*. *Experientia*, 43:439–440, 1987.
- A. H. Millar and D. A. Day. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett*, 398:155–158, 1996.
- A. H. Millar and D. A. Day. Alternative solutions to radical problems. *Trends Plant Sci*, 2:289–290, 1997.
- A. H. Millar, J. T. Wiskich, J. Whelan, and D. A. Day. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett*, 329:259–262, 1993.
- F. F. Millenaar. *The alternative oxidase in roots of Poa species: in vivo regulation and function*. Thèse de doctorat, Universiteit Utrecht, 2000.
- N. Minagawa, S. Koga, M. Nakano, S. Sakajo, and A. Yoshimoto. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett*, 302:217–219, 1992.
- I. Minko, S. P. Holloway, S. Nikaido, M. Carter, O. W. Odom, C. H. Johnson, and D. L. Herrin. *Renilla* luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet*, 262:421–425, 1999.
- I. M. Moller. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52:561–591, 2001.
- I. M. Moller, A. Berczi, L. H. W. van der Plas, and H. Lambers. Measurement of the activity and capacity of the alternative pathway in intact plant tissues: identification of problems and possible solutions. *Physiol Plant*, 72:642–649, 1988.
- A. L. Moore, I. B. Dry, and J. T. Wiskich. Measurement of the redox state of the ubiquinone pool in plant mitochondria. *FEBS Lett*, 235:76–80, 1988.
- A. L. Moore and J. N. Siedow. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1059:121–140, 1991.
- A. L. Moore, A. L. Umbach, and J. N. Siedow. Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. *J Bioenerg Biomembr*, 27:367–377, 1995.
- J. Moseley, J. Quinn, M. Eriksson, and S. Merchant. The *Crd1* gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J*, 19:2139–2151, 2000.
- F. W. Muller, G. L. Igloi, and C. F. Beck. Structure of a gene encoding heat-shock protein HSP70 from

- the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 111:165–173, 1992.
- M. T. Navarro, E. Guerra, E. Fernandez, and A. Galvan. Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 122:283–289, 2000.
- M. Ohresser, R. F. Matagne, and R. Loppes. Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the *nit1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, 31:264–271, 1997.
- M. Orsel, S. Filleur, V. Fraissier, and F. Daniel-Vedele. Nitrate transport in plants: which gene and which control? *J Exp Bot*, 53:825–833, 2002.
- M. Padua, S. Aubert, A. Casimiro, R. Bligny, A. H. Millar, and D. A. Day. Induction of alternative oxidase by excess copper in sycamore cell suspensions. *Plant Physiol Biochem*, 37:131–137, 1999.
- H. L. Parsons, J. Y. Yip, and G. C. Vanlerberghe. Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. *Plant Physiol*, 121:1309–1320, 1999.
- G. Periz and L. R. Keller. DNA elements regulating α_1 -tubulin gene induction during regeneration of eukaryotic flagella. *Mol Cell Biol*, 17:3858–3866, 1997.
- V. N. Popov, R. A. Simonian, V. P. Skulachev, and A. A. Starkov. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H_2O_2 production in plant mitochondria. *FEBS Lett*, 415:87–90, 1997.
- F. J. Potter, E. Bennett, and J. T. Wiskich. Effects of ageing and salicylate on betroot mitochondria. *Aust J Plant Physiol*, 27:445–450, 2000.
- A. C. Purvis and R. L. Shewfelt. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissue? *Physiol Plant*, 88:712–718, 1993.
- A. Quesada and E. Fernandez. Expression of nitrate assimilation related genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*, 24:185–194, 1994.
- A. Quesada, A. Galvan, and E. Fernandez. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 5:407–419, 1994.
- A. Quesada, A. Galvan, R. A. Schnell, P. A. Lefebvre, and E. Fernandez. Five nitrate assimilation-related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*, 240:387–394, 1993.
- A. Quesada, I. Gomez, and E. Fernandez. Clustering of the nitrite reductase gene and a light-regulated gene with nitrate assimilation loci in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 206:259–265, 1998a.
- A. Quesada, I. Gomez-Garcia, and E. Fernandez. Involvement of chloroplast and mitochondria redox valves in nitrate assimilation. *Trends Plant Sci*, 5:463–464, 2000.
- A. Quesada, J. Hidalgo, and E. Fernandez. Three *Nrt2* genes are differentially regulated in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*, 258:373–377, 1998b.
- J. M. Quinn, P. Barraco, M. Eriksson, and S. Merchant. Coordinate copper- and oxygen-responsive *Cyc6* and *Cpx1* expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *J Biol Chem*, 275:6080–6089, 2000.
- J. M. Quinn, M. Eriksson, J. L. Moseley, and S. Merchant. Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiol*, 128:463–471, 2002.
- J. M. Quinn and S. Merchant. Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas Cyc6* gene function as targets for transcriptional activators. *Plant Cell*, 7:623–628, 1995.
- J. M. Quinn and S. Merchant. Copper-responsive gene expression during adaptation to copper deficiency. *Methods Enzymol*, 297:263–279, 1998.
- J. M. Quinn and S. Merchant. Adaptation of *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) to copper-deficiency: transcriptional regulation of *Pcy1* but not *Cpx1*. *J Phycol*, 35:1253–1263, 1999.
- J. M. Quinn, S. S. Nakamoto, and S. Merchant. Induction of coproporphyrinogen oxidase in *Chlamydomonas* chloroplasts occurs via transcriptional regulation of *Cpx1* mediated by copper response elements and increased translation from a copper deficiency-specific form of the transcript. *J Biol Chem*, 274:14444–14454, 1999.
- J. D. Quisel, D. D. Wykoff, and A. R. Grossman. Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 111:839–848, 1996.

- C. Remacle, D. Baurain, P. Cardol, and R. F. Matagne. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I. Characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics*, 158:1051–1060, 2001a.
- C. Remacle, F. Duby, P. Cardol, and R. F. Matagne. Mutations inactivating mitochondrial genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Soc Trans*, 29: 442–446, 2001b.
- C. Remacle and R. F. Matagne. Mitochondrial genetics. In J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, editors, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Advances in Photosynthesis, pages 661–674. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- J. Rexach, A. Llamas, E. Fernandez, and A. Galvan. The activity of the high-affinity nitrate transport system I (NRT2;1, NAR2) is responsible for the efficient signalling of nitrate assimilation genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 215:606–611, 2002.
- J. Rexach, B. Montero, E. Fernandez, and A. Galvan. Differential regulation of the high affinity nitrite transport systems III and IV in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 274:27801–27806, 1999.
- A. Reyes-Prieto, M. El-Hafidi, R. Moreno-Sanchez, and D. Gonzalez-Halphen. Characterization of oxidative phosphorylation in the colorless chlorophyte *Polytomella* sp. Its mitochondrial respiratory chain lacks a plant-like alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1554:170–179, 2002.
- D. M. Rhoads and L. McIntosh. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:2122–2126, 1991.
- D. M. Rhoads and L. McIntosh. Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell*, 4:1131–1139, 1992.
- D. M. Rhoads and L. McIntosh. The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of sequence similarity in their promoters. *Plant Mol Biol*, 21:615–624, 1993.
- D. M. Rhoads, A. L. Umbach, C. R. Sweet, A. M. Lennon, G. S. Rauch, and J. N. Siedow. Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in α -keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J Biol Chem*, 273: 30750–30756, 1998.
- M. Ribas-Carbo, J. O. Berry, J. Azcon-Bieto, and J. N. Siedow. The reaction of the plant mitochondrial cyanide-resistant alternative oxidase with oxygen. *Biochim Biophys Acta*, 1188:205–212, 1994.
- P. R. Rich. Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase. *FEBS Lett*, 96:252–256, 1978.
- S. A. Robinson, M. Ribas-Carbo, D. Yakir, L. Giles, Y. Reuveni, and J. O. Berry. Beyond SHAM and cyanide: opportunities for studying the alternative oxidase in plant respiration using oxygen isotope discrimination. *Aust J Plant Physiol*, 22:487–496, 1995.
- J. D. Rochaix. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet*, 29:209–230, 1995.
- J. M. Romero and C. Lara. Photosynthetic assimilation of NO_3^- by intact cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Influence of NO_3^- and NH_4^+ assimilation on CO_2 fixation. *Plant Physiol*, 83:208–212, 1987.
- D. Saisho, M. Nakazono, K.-H. Lee, N. Tsutsumi, S. Akita, and A. Hirai. The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from *Arabidopsis thaliana* consists of five exons unlike other AOX genes and is transcribed at an early stage during germination. *Genes Genet Syst*, 76:89–97, 2001a.
- D. Saisho, M. Nakazono, N. Tsutsumi, and A. Hirai. ATP synthesis inhibitors as well as respiratory inhibitors increase steady-state level of alternative oxidase mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 158:241–245, 2001b.
- D. Saisho, E. Nambara, S. Naito, N. Tsutsumi, A. Hirai, and M. Nakazono. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 35:585–596, 1997.
- S. Sakajo, N. Minagawa, T. Komiyama, and A. Yoshimoto. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-

- resistant respiration in *Hansenula anomala*. *Biochim Biophys Acta*, 1090:102–108, 1991.
- S. Sakajo, N. Minagawa, and A. Yoshimoto. Characterization of the alternative oxidase protein in the yeast *Hansenula anomala*. *FEBS Lett*, 318:310–312, 1993.
- S. Sakajo, N. Minagawa, and A. Yoshimoto. Effects of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin A-treated yeast *Hansenula anomala*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61:396–399, 1997.
- F. B. Salisbury and C. W. Ross. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont, CA, USA, 4 edition, 1992.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2 edition, 1989.
- F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463–5467, 1977.
- J. A. Schloss. A *Chlamydomonas* gene encodes a G protein β subunit-like polypeptide. *Mol Gen Genet*, 221:443–452, 1990.
- I. Schomburg, A. Chang, O. Hofmann, C. Ebeling, F. Ehrentreich, and D. Schomburg. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem Sci*, 27:54–56, 2002a.
- I. Schomburg, A. Chang, and D. Schomburg. BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res*, 30:47–49, 2002b.
- O. Schreiner, T. Lien, and G. Knutsen. The capacity for arylsulfatase synthesis in synchronous and synchronized cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 384:180–193, 1975.
- M. Schroda, O. Vallon, F. A. Wollman, and C. F. Beck. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell*, 11:1165–1178, 1999.
- A. Sesay, C. R. Stewart, and R. M. Shibles. Effects of KCN and salicylhydroxamic acid on respiration of soybean leaves at different ages. *Plant Physiol*, 82: 443–447, 1986.
- J. N. Siedow. Bioenergetics: the mitochondrial electron transfer chain. In C. S. I. Levings and I. K. Vasil, editors, *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*, volume 3 of *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, pages 281–312. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- J. N. Siedow and A. L. Moore. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1142:165–174, 1993.
- J. N. Siedow and A. L. Umbach. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell*, 7:821–831, 1995.
- J. N. Siedow and A. L. Umbach. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1459:432–439, 2000.
- J. N. Siedow, A. L. Umbach, and A. L. Moore. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett*, 362:10–14, 1995.
- C. D. Silflow. Organization of the nuclear genome. In J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, editors, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, *Advances in Photosynthesis*, pages 25–40. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- B. H. Simons, F. F. Millenaar, L. Mulder, L. C. Van Loon, and H. Lambers. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant Physiol*, 120:529–538, 1999.
- F. E. Sluse and W. Jarmuszkiewicz. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz J Med Biol Res*, 31:733–747, 1998.
- R. P. Smith and D. E. Wilcox. Toxicology of selected nitric oxide-donating xenobiotics, with particular reference to azide. *Crit Rev Toxicol*, 24:355–377, 1994.
- M. H. Spalding. CO₂ acquisition. Acclimation to changing carbon availability. In J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, editors, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, *Advances in Photo-*

- synthesis, pages 529–547. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- D. R. Stevens, J. D. Rochaix, and S. Purton. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet*, 251:23–30, 1996.
- Y. Sugase, M. Hirono, K. L. Kindle, and R. Kamiya. Cloning and characterization of the actin-encoding gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 168:117–121, 1996.
- M. Tanudji, I. Djajanegara, D. O. Daley, T. C. McCabe, P. M. Finnegan, D. A. Day, and J. Whelan. The multiple alternative oxidase proteins of soybean. *Aust J Plant Physiol*, 26:337–344, 1999.
- H. Teramoto, T. Ono, and J. Minagawa. Identification of *Lhcb* gene family encoding the light-harvesting chlorophyll-*a/b* proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*, 42: 849–856, 2001.
- D. H. Turpin, H. G. Weger, and H. C. Huppe. Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation. In D. T. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre, and D. B. Layzell, editors, *Plant Metabolism*, pages 509–524. Addison Wesley Longman, Harlow, UK, 2 edition, 1997.
- A. L. Umbach, M. A. Gonzalez-Meler, C. R. Sweet, and J. N. Siedow. Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1554:118–128, 2002.
- A. L. Umbach and J. N. Siedow. Covalent and non-covalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol*, 103:845–854, 1993.
- A. L. Umbach and J. N. Siedow. The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide-resistant oxidase with sulfhydryl reagents suggests that α -keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal. *J Biol Chem*, 271:25019–25026, 1996.
- A. L. Umbach and J. N. Siedow. The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 378:234–245, 2000.
- A. L. Umbach, J. T. Wiskich, and J. N. Siedow. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett*, 348:181–184, 1994.
- C. W. van den Bergen, A. M. Wagner, K. Krab, and A. L. Moore. The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. Interplay between quinol-oxidizing and quinone-reducing pathways. *Eur J Biochem*, 226: 1071–1078, 1994.
- J. Vanderleyden, C. Peeters, H. Verachtert, and H. Bertrand. Stimulation of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* by nucleoside phosphates. *Biochem J*, 188:141–144, 1980.
- G. C. Vanlerberghe, D. A. Day, J. T. Wiskich, A. E. Vanlerberghe, and L. McIntosh. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria (Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation). *Plant Physiol*, 109: 353–361, 1995.
- G. C. Vanlerberghe and L. McIntosh. Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. *Plant Physiol*, 100:1846–1851, 1992a.
- G. C. Vanlerberghe and L. McIntosh. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol*, 100:115–119, 1992b.
- G. C. Vanlerberghe and L. McIntosh. Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiol*, 105:867–874, 1994.
- G. C. Vanlerberghe and L. McIntosh. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol*, 111:589–595, 1996.
- G. C. Vanlerberghe and L. McIntosh. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48:703–734, 1997.
- G. C. Vanlerberghe, L. McIntosh, and J. Y. Yip. Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell*, 10:1551–1560, 1998.

- G. C. Vanlerberghe, A. E. Vanlerberghe, and L. McIntosh. Molecular genetic alteration of plant respiration (Silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic tobacco). *Plant Physiol*, 106:1503–1510, 1994.
- G. C. Vanlerberghe, A. E. Vanlerberghe, and L. McIntosh. Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism. *Plant Physiol*, 113:657–661, 1997.
- G. C. Vanlerberghe, J. Y. Yip, and H. L. Parsons. In organello and in vivo evidence of the importance of the regulatory sulfhydryl/disulfide system and pyruvate for alternative oxidase activity in tobacco. *Plant Physiol*, 121:793–803, 1999.
- K. P. VanWinkle-Swift. Maturation of algal zygotes: alternative experimental approaches for *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *J Phycol*, 13: 225–231, 1977.
- J. M. Vega, J. Herrera, P. J. Aparicio, A. Paneque, and M. Losada. Role of molybdenum in nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol*, 48:294–299, 1971.
- P. Villand, M. Eriksson, and G. Samuelsson. Carbon dioxide and light regulation of promoters controlling the expression of mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem J*, 327: 51–57, 1997.
- A. M. Wagner. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett*, 368:339–342, 1995.
- A. M. Wagner and K. Krab. The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiol Plant*, 95:318–325, 1995.
- A. M. Wagner and A. L. Moore. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep*, 17: 319–333, 1997.
- A. M. Wagner and M. J. Wagner. Changes in mitochondrial respiratory chain components of petunia cells during culture in the presence of antimycin A. *Plant Physiol*, 115:617–622, 1997.
- D. Walker. *The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurement of Photosynthesis*. Oxygraphics Ltd, University of Sheffield print unit, Packard Publishing Ltd and Hansatech Instruments Ltd, UK, 1987.
- H. G. Weger and R. Dasgupta. Regulation of alternative pathway respiration in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *J Phycol*, 29:300–308, 1993.
- J. Whelan, L. McIntosh, and D. A. Day. Sequencing of a soybean alternative oxidase cDNA clone. *Plant Physiol*, 103:1481, 1993.
- J. Whelan, A. H. Millar, and D. A. Day. The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta*, 198:197–201, 1996.
- J. Whelan, M. K. Smith, M. Meijer, J. W. Yu, M. R. Badger, G. D. Price, and D. A. Day. Cloning of an additional cDNA for the alternative oxidase in tobacco. *Plant Physiol*, 107:1469–1470, 1995.
- A. Wiseman, N. W. Gillham, and J. E. Boynton. Nuclear mutations affecting mitochondrial structure and function in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol*, 73:56–77, 1977.
- D. Wu, D. A. Wright, C. Wetzel, D. F. Voytas, and S. Rodermeil. The IMMUTANS variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, 11:43–55, 1999.
- Z. Xie and Z. Chen. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol*, 120:217–226, 1999.
- H. Yamasaki. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355:1477–1488, 2000.
- H. Yamasaki, Y. Sakihama, and S. Takahashi. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci*, 4:128–129, 1999.
- J. Y. Yip and G. C. Vanlerberghe. Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiol Plant*, 112:327–333, 2001.
- H. Yukioka, S. Inagaki, R. Tanaka, K. Katoh, N. Miki, A. Mizutani, and M. Masuko. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 1442:161–169, 1998.

D. Zhang and P. A. Lefebvre. *FAR1*, a negative regulatory locus required for the repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 146:121–133, 1997.

Q. Zhang, L. Mischis, and J. T. Wiskich. Respiratory responses of pea and wheat seedlings to chloramphenicol treatment. *Aust J Plant Physiol*, 23:583–592, 1996.

K. Zimmermann, D. Schogl, and J. W. Mannhalter. Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *Biotechniques*, 24: 582–584, 1998.

Sixième partie

Annexes

Annexe A

Origine du cDNA chimérique *Aox1*

Cette Annexe se propose d'analyser en détail la structure du segment de 188 pb étranger au cDNA *Aox1* (Figure A.1) déjà abordée dans les Résultats, chapitre 4, section 4.4.

```
1  aattccggtgactcgaatgttgcggtggaatggaccaag 40
41  atgacccttgagcattgaagagaagaaccccgacagaagt 80
81  gaaggccactccctgatgccagggaacaaaaacagagcc 120
121 atcaatagcaaaacaaagcctgcaaacgctccactccac 160
161 tcctgcaggactatgcacaatctttacgTAAATCCTCTCT 200
201 CGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGTTACGTCACCGTT 240
241 CGATATCGCGATGCTTCAGACCGCACCTATGCTTCCGGGC 280
281 CTTGGGCCACACCTCGTCCCGCAATTGGGAGCCCTGGCCA 320
321 GCGCTTCTCGTCTTCTGGGCTCCATAGCTTCGGTTCCGCC 360
361 CCAGCACGGTGGTGGCTTCCAGGCTGTCCGGGGATTTC 400
401 GCCACGGGCGCGGTGAGCACGCCTGCTGCCAGCTCCCCG 440
```

FIG. A.1. Extrémité 5' de la séquence nucléotidique du cDNA *Aox1*, telle que décrite à l'automne 1998. Le segment de 188 pb étranger au cDNA est typographié en lettres minuscules, tandis que l'origine de transcription (T^{189}) et le codon initiateur (ATG) du gène sont en caractères gras.

Comme le montre la Figure A.2 (p. 99), ce segment comprend deux régions homologues à deux segments (couvrant 200 pb) de la 3'-UTR de l'EST BE442271 (583 pb). Dans le cDNA *Aox1*, ces deux segments sont fusionnés tête-bêche au niveau d'une courte séquence de 10 pb présente dans chacun d'entre eux. Par ailleurs, un troisième segment du même EST reproduit presque parfaitement les 248 derniers nucléotides de la région codante du gène *LhcII-1.3*. Cette homologie s'arrête néanmoins au niveau de la 3'-UTR de ce dernier.

Ces observations suggèrent donc que le segment de 188 pb étranger au cDNA *Aox1* correspond probablement à la 3'-UTR remaniée d'un gène de la famille *LhcII-1.3*. Ce gène ne serait pas encore répertorié dans GenBank, mais déjà bien représenté dans les banques d'ESTs de *C. reinhardtii*.

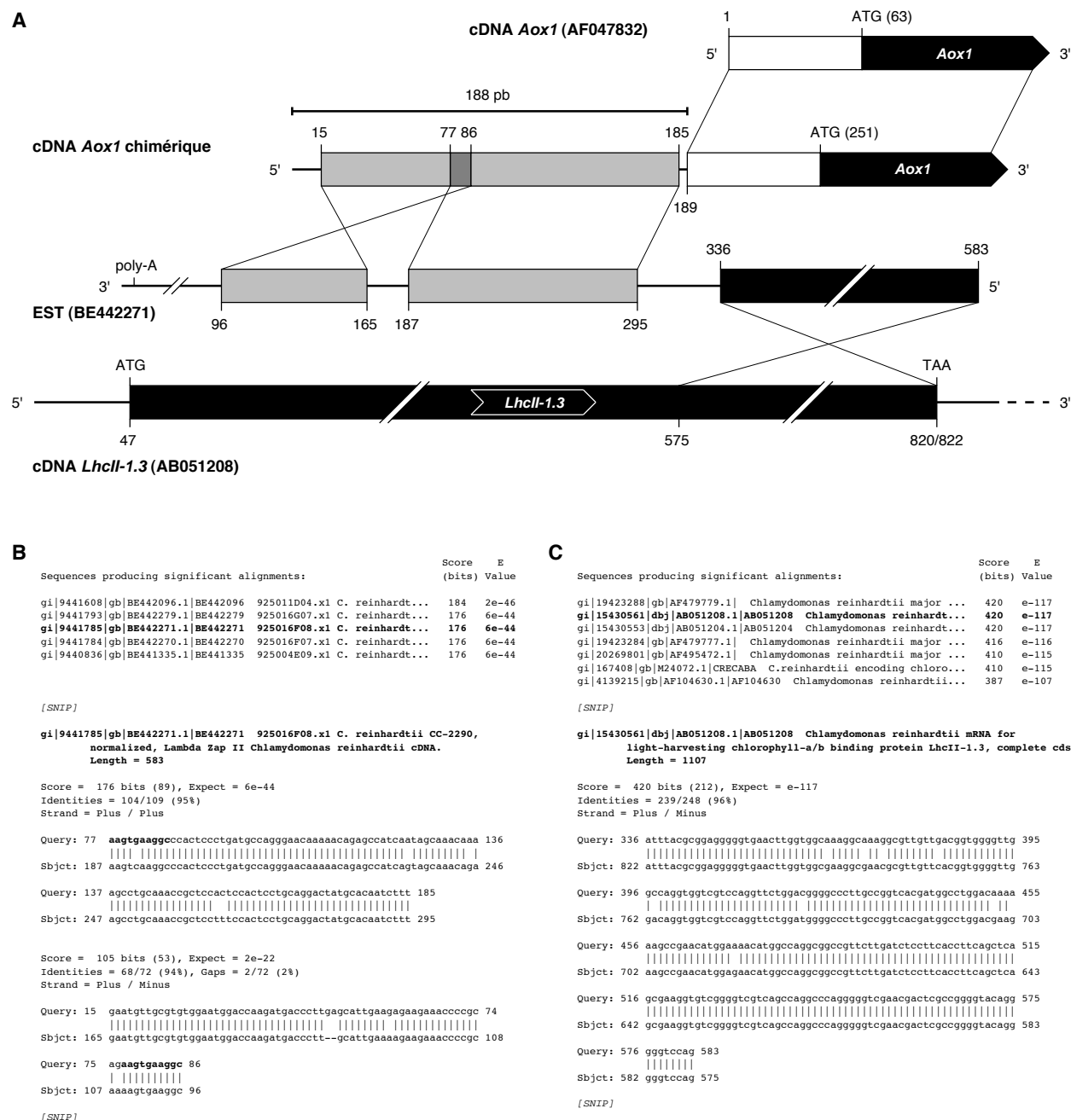


FIG. A.2. Structure du segment étranger au cDNA *Aox1*. A. Représentation schématique du cDNA chimérique *Aox1* montrant la localisation du segment de 188 pb, ainsi que ses régions d'homologie (en gris, connectées par des lignes minces) avec l'EST BE442271, lui-même partiellement homologue au gène *LhcII-1.3*. La numérotation est propre à chaque séquence et l'échelle est doublée dans les segments traversés d'une paire de barres obliques (/). La zone en gris foncé correspond aux 10 pb en caractères gras dans le panneau B. poly-A: position du début de la queue poly-adénylée. B et C. Reproduction partielle des résultats de BLASTn détaillant les alignements qui ont guidé les tracés du panneau A. Dans le panneau B, le segment de 188 pb était testé contre les ESTs de *C. reinhardtii*, alors que dans le panneau C, l'EST homologue le plus long (BE442271) était testé contre les séquences génomiques du même organisme. Les 10 pb responsables de la fusion des deux segments d'EST dans le cDNA chimérique sont en caractères gras.

Annexe B

Séquences nucléotidiques

Séquences nucléotidiques partielles des constructions déterminées à partir des données de séquençage des zones de jonction couplées aux entrées *ad hoc* de GenBank. Numéros d'accèsion : X52325 (vecteur pBluescript SK+), X52304 (cDNA *Ars*), X16179 (région 5' du gène *Ars*), AF333184 (gène *Ars2*), X04472 (gène *TubB2*), AF537323 (région 5' du gène *Aox1*), AF537324 (région 5' du gène *Aox2*). Les fragments de régions 5' *Aox1* (ou *Aox2*) insérés par nos soins sont soulignés, alors que le segment *TubB2* introduit par Davies et Grossman (1994) est en lettres minuscules. Les TATA boxes, origines de transcription, codons initiateurs et terminateurs sont en caractères gras, tandis que le début de la séquence codante *Ars* est représenté en gris. Les sites de restriction, de même que les jonctions entre extrémités incompatibles, sont montrés sur fond gris : *Kpn*I (GGTACC), *Sal*I (GTCGAC), *Eco*RI-*Sfi*I (GAATTAGGCC), *Nhe*I-*Sal*I (GCTAGTCGAC), *Nru*I-*Sal*I (TCGTCGAC), *Sal*I-*Eco*RI (GTCGAAATTC), *Sal*I-*Nhe*I (GTCGACTAGC), *Sal*I-*Xho*I (GTCGAG), *Xho*I-*Sal*I (CTCGAC). Lorsque l'origine de transcription est connue, elle occupe la position +1 dans la numérotation des nucléotides.

B.1 Plasmides pJD54 et pJD100

B.1.1 pJD54 (Davies et al. 1992)

```
1  GGCGCGTCCCATTCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGG  40
41  AAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCT  80
81  GGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTA  120
121  ACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGG  160
161  CCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG  200
201  TACCGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTT  240
241  GATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGGG  280
281  ATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAAG  320
321  ATGGGTGCGCTCGCGTGTTCGCGCTCGCTTGCCTCGCGG  360
361  CAGTGGCGTCCGTTGCGCATGCGGCCGACACCAAAAGCC  400
401  CAACCTTTGTGGTGATCTTACCCTAAGTATGCCGAGTAGA  440
441  CTGGGGGCGCGACGGGGACGGGGACGGTTTATAGCTGTCA  480
481  GACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTFTA  520
521  TCGCCGAACCGGTTCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGCT  560
561  AACTTCCCTCTGTGCCCTTCTGGTCTGTCTCTCTGTCT  600
```

B.1.2 pJD100 (Davies et Grossman 1994)

```
-240  TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG  -201
-200  CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGC  -161
-160  TGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTCCAG  -121
-120  TCACGACGTTGTAAACGACGCGCAGTGAATTGTAATACG  -81
-80  ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGA  -41
-40  GGTGCACTgttttaaatagccaggcccccgattgcaaagac  -1
1  attatagcgagctaccaaagccatttcaaacacctagat  40
41  cactaccacttctacacaggccactCGAGGTGCGACGGTAT  80
81  CGATAAGCTTGATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGG  120
121  ATCGTTTGGGATCGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGA  160
161  AACCATCAAGATGGGTGCCCTCGCGGTGTTCCGCGTCTG  200
201  TGCCTCGCGCAGTGGCGTTCGCTGCGCATGCGGCCGACA  240
241  CCAAAAGCCCAACTTTGTGGTGTATCTTACCGTAAATGAT  280
281  GCGGAGTAGACTGGGGGCCCGGACGGGGACGGGGACGGTT  320
321  TTAGCTGTGAGACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAAC  360
361  GGGGTGTTTATCGCCGACCGGTTCTCCCTGCCATCCTT  400
401  TCGCTCTGCTAACTTCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGTCC  440
```

B.2 Constructions chimériques *Aox1/Ars* et *Aox2/Ars*

B.2.1 *Aox1/Ars*

```
-1600  CAGGGCGCGTCCCATTGCGCAATTCAGGCTGCGCAACTGTT  -1561
-1560  GGGAAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA  -1521
-1520  GCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGCGATTAAAGTTGG  -1481
-1480  GTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGA  -1441
-1440  CGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATT  -1401
-1400  GGTGACCGGGCCCCCTCGAGGTCGAAATTCGATTAAAGT  -1361
-1360  AGTCGACGCGCTGATGACATCTTTCGCGCTCTCGCTACAAG  -1321
-1320  TGCAAGCTTCTGAGGCGTGGGGGCGGCGCGTTCAACTAG  -1281
-1280  TGCGATCGACTGCTGGCAACACAAGTTGTGATTGATGGTG  -1241
-1240  CAGTTGGCGTCTGATGCGCGTGCACACGCTCTCAACGAG  -1201
-1200  TGTGTGCTTGTCTACCGCCCTGTATGACCAAGAGCAATAC  -1161
-1160  TCTGGACGCTCTGCGGCACCGATATATGTTAGACGAGGTGC  -1121
-1120  ACGGAAAAGCGCAGAACACGCGCCCTTGTCCAGTGTGCTA  -1081
-1080  TACTGGAAGACGTCATGTGGCTGCCCGCGTGGCAACTGA  -1041
-1040  CTTCCGTGTTTCTTGTGTTATAAGTTCTGTTGGTGTATCA  -1001
-1000  AAAGCTGCTGGTGCACCGTAGGGCGAGCGCGCCGACGGGA  -961
-960  TACTTCCGTTGTGACCCGAGAACCTTACAGGCGCTGCCAG  -921
-920  AATGACATCTGAAACCTTTTGAAGAGAAATTTGCTTGT  -881
-880  AGTTTGTTCGAGCTATTATCGTGGCCTGCGAGCATGGC  -841
-840  GGTTCGCGTGGCGGTTGGGTCCGCTGGAAGGTTCGCTTCA  -801
-800  CCAAAAGTGAGCCGAGAGGCTTACGACTACACACAGCA  -761
-760  TATGAAGTGCAAAATGAAGGTCGTGGGTACTTACGGGT  -721
-720  TCCTTGAGATGTGCAAGTGTGTTGGTTTCGAGGTTTTCGG  -681
-680  ATCCCTTTCATACAGTAGCTTTCCCTCTCTGCGCATGAC  -641
-640  TATGCTGTGATGACGTTAGGTAGTTGACATTACATGCTAC  -601
-600  CGTGTCTGCGAGGAGCGCGCACCGCCCTTGTGCAAGTACGT  -561
```

-560 CCCCAAGATGCAAGATGCAACTGTGGGGCAGGGGAGGGGT -521
-520 TCTTAGCACGGAAGAACGCGCCCAATTAATGAGCCACCA -481
-480 GAGCTGCGGTGTCGTCGAGATGACAGCGACCTAGGTACAT -441
-440 AGGCCATCAGCGGAAGGCGGATGCGCATGCCTCAGCGCAAG -401
-400 GCTCAAGACATGGCTGAGTAAGTAAGGCCGGTTGAGTGCT -361
-360 CTATGCCCTCTGCGCTTTGATCCCCGCGACGTCCCCGCAC -321
-320 ACGCAGCAATTGAGCAGTTCGGTTCATCAAGCCTCCCAGGC -281
-280 GGCCGCTCGGCATCCAGGGGCTCGGCCTCGACGTGCAACC -241
-240 CGATGCGCGTGCAGCGGTTGCCCCACCGTGCTTCTGTG -201
-200 CTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCTGTAG -161
-160 ATTACAACGTTGCGGCGGGGTCGACACCAGTGATCAGC -121
-120 AACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAGTGCCTTCCGGTGC -81
-80 ATGCAACATGTGAGCGCCTGCTCGAATCGTCTACACTGGA -41
-40 ACTTCGAAAACGTAATTAATCTGTTCTTTACTATAACGGGC -1
1 TAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGT 40
41 TACGTCACCGTTTCGATATCGTTCGACGGTATCGATAAGCTT 80
81 GATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGGG 120
121 ATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAAG 160
161 ATGGGTGCGCTCGCGGTGTTGCGCCGTCGCTTGCCCTCGCGG 200
201 CAGTGGCGTCGGTTGCGCATGCGGCCGACACCAAAAGCC 240
241 CAACTTTGTGGTGATCTTCACCGTAAGTATGCCGAGTAGA 280
281 CTGGGGGCGCGGACGGGGACGGGACGGGTTTATGCTGTCA 320
321 GACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTTTA 360
361 TCGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGCT 400
401 AACCTCCCTGTGTGCCCTTCTGGTCTGTCTCTGCTTGTCT 440

B.2.2 Aox2/Ars

1 CATTGCGCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGAT 40
41 CGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAG 80
81 GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAAGCCAGG 120
121 TTTTCCCACTACGACGTTGTAAGGACGAGGCCAGTGAAT 160
161 TGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGGC 200
201 CCCCCTCAGAGTTCGACTAGCAGGGGCTGGGGCTGAGGGTG 240
241 CACGTGTTGATTGGCGGCGAGTGACGTGACTAGTTTGTTA 280
281 GCTGCGGGTTAGCACGGACTGTGACCCCAACCAACCGGC 320
321 CACGTCCGGATTGCGGGGATGCCAAAGGCCCAACATA 360
361 GAGGCGTGTGCTTAGTAGCGCGCCGCTCAAGGTGGCTGG 400
401 GTGTATAATGACCCGGGATCAGCCCTTTTCCTGCCATAAG 440
441 CAGCCACCTCTTTGTTTATGACGCTCGATAACATGGCCGG 480
481 CCTCAGACATCAAGCCGTGAGCGGTGTCAGCACAGCGTGA 520
521 CAGATGTCTGATCACTTATGAGGCGGCGAGGCGGTTTCCCT 560
561 CGCCTTCCCTCCGTTGTGTCGCACTTCTCGGCCCGCGAGC 600
601 ACAGCAGAGCGGTGCGTGTCAAACGTCAAATGCGCTTTG 640
641 GGAACTCCCGACGCCCTCTTACACGTGACGAGGCTAAA 680
681 ACGCGCTGTCTGCATGTTAGCCCTTATGTTGAAAATGAGA 720
721 AAGAGAAGAACAAATAAGAAACAGCGGCGCGCCACAAAG 760
761 GTGACCGCGGGGTGACGAAGCGCCACCGGCTGTGCTGCGTG 800
801 GGTGGTTTTTGGTCCCTCAACCCGAGCGCACCCGCCCTGGC 840
841 TCGGGCTGCGGCATCGCATGCCAAGTCTTATTTACATTTG 880
881 ATATGCTCAAAATGTTTTTGGAGATACAGTTGCAGGTTTTG 920
921 TAAGGATAGCGTAAACGCTTAAGGCGAGCGGAATGGATTGT 960
961 CGGTGTTGCGGAACACGCACTTTTCTTTTGGCAAACTTTG 1000
1001 GTGACTGTCTTACGCACTACCGGCTACCTCTATATTTTC 1040
1041 GCTTTCTGGTGACCCGCGTGTGTTACCGGCGCTGTACCG 1080
1081 ACCTGTTACGTTATGGCGACAGACGGGTAACGCGCCACGC 1120
1121 ATTTGTGGGGCGACCGTTGTCGCGCCGCAATGCCCGGTGTA 1160
1161 TAAGAAGCAGACACGTAACCGGACACGATGTTTTCGTGC 1200
1201 TTTATAATAGCGTCGAGTCGAAACTTCCATTGCGCTGCTC 1240
1241 CTGCTGTCTGCTGCTCGCTAGTCGACGGTATCGATAAGCTT 1280
1281 GATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGGG 1320
1321 ATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAAG 1360
1361 ATGGGTGCGCTCGCGGTGTTGCGCGTCTGCTTGCCCTGCGG 1400
1401 CAGTGGCGTCGGTTGCGCATGCGGCCGACACCAAAAGCC 1440
1441 CAACTTTGTGGTGATCTTCACCGTAAGTATGCCGAGTAGA 1480
1481 CTGGGGGCGCGGACGGGGACGGGACGGTTTATGCTGTCA 1520
1521 GACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTTTA 1560
1561 TCGCCGAACCGGTTCTCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGCT 1600
1601 AACCTCCCTGTGTGCCCTTCTGGTCTGTCTCTGCTTGTCT 1640

B.3 Constructions chimériques Aox1Δ1/Ars à Aox1Δ6/Ars

B.3.1 Aox1Δ1/Ars

-1320 CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTA -1281
-1280 TTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT -1241
-1240 TAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTTTCCAGTCACGACGTTG -1201
-1200 TAAACGACGCGCAGTGAATTTGTAATACGACTCACTATAG -1161
-1160 GGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGAGGTGC -1121
-1120 ACGGAAGCGCAGAACCCAGCGCCCTTGTCAGTGTCTGTA -1081
-1080 TACTGGAAAACGTCCTATGTGGCTGCCCCCTGGCAACTGA -1041
-1040 CTTCGGTGTCTTCTGTGTATAAGTTCCTGTGTGGTGTATCA -1001
-1000 AAAGCTGCTGGTGACCGTAGGGCGAGCGCCGACGGGA -961
-960 TACTTCGGTGTGACCCCGAGAACCCCTACAGGCGCTGCCAG -921
-920 AATGACATCTGAAACCTTTTTGAAAGAGAAATTTGCTGTTG -881
-880 AGTTTGTTCAGAGCTATTATCGTGGCCTCGGAGCTGCTGC -841
-840 GGTTGCGGTGGCGGTTGGGTCGCGCTGGAAGGTGCTTCA -801
-800 CCAAAAGTGAGCCGGAGGGCTTACGACTACACACACGAA -761
-760 TATGAAAGTGCAAAAATGAAGGGTCTGGGTACTTACGGGT -721
-720 TCCTTGAGATTGTCAAGTGTGTTGGTTTCGAGGTTTTTCGGC -681
-680 ATCCCTCTCATACAGTAGCTTTTCCCTCTCCTTGCCATGAC -641
-640 TATGCTGTGATGCACTTAGGTAGTTGACATTCACTAGTAC -601
-600 CGTGCTGCGAGGAGCGCGCACCCGCCCTTGTCACGTACGT -561
-560 CCCCAAGATGCAAGATGCAACTGTGGGGCAGGGGAGGGGT -521
-520 TCTTAGCACGGAAGAACGCGCCCAATTAATGAGCCACCA -481
-480 GAGCTGCGGTGTCGTCGAGATGACAGCGACCTAGGTACAT -441
-440 AGGCCATCAGCGGAAGGCGGATCGCATGCCTCAGCGCAAG -401
-400 GCTCAAGACATGGCTGAGTAAGTAAGGCCGGTTGAGTGCT -361
-360 CTATGCCCTCTGCGCTTTGATCCCCGCGACGTCCCCGCAC -321
-320 ACGCAGCAATTGAGCAGTTCGGTTCATCAAGCCTCCCAGGC -281
-280 GGCGCTCGGCATCCAGGGGCTCGGCCTCGACGTGCAACC -241
-240 CGATGCGCGTGCAGCGGTTGGGCCACCGTGCTTCTGTG -201
-200 CTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCTGTAG -161
-160 ATTACAACGTTGCGGCGGGGTCGACACCAGTGATCAGC -121
-120 AACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAGTGCCCTCCGGTGC -81
-80 ATGCAACATGTGAGCGCCTGCTCGAATCGTCTACACTGGA -41
-40 ACTTCGAAAACGTAATTAATCTGTTCTTTACTATAACGGGC -1
1 TAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGT 40
41 TACGTCACCGTTTCGATATCTTCGACGGTATCGATAAGCTT 80
81 GATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGGG 120
121 ATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAAG 160
161 ATGGGTGCGCTCGCGGTGTTGCGCCGTCGCTTGCCCTCGCGG 200
201 CAGTGGCGTCGGTTGCGCATGCGGCCGACACCAAAAGCC 240
241 CAACTTTGTGGTGATCTTCACCGTAAGTATGCCGAGTAGA 280
281 CTGGGGGCGCGGACGGGGACGGGACGGGTTTATGCTGTCA 320
321 GACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTTTA 360
361 TCGCCGAACCGGTTCTCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGCT 400
401 AACCTCCCTGTGTGCCCTTCTGGTCTGTCTCTGCTTGTCT 440

B.3.2 Aox1Δ2/Ars

-1160 TACAGGGCGCGTCCCATTGCGCAATTAGGCTGCGCAACTG -1121
-1120 TTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGC -1081
-1080 CAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTT -1041
-1040 GGGTAACGCCAGGGTTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAGAAC -1001
-1000 GACGGCAGTGAATTTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA -961
-960 TTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGAGGCGCTGCCAG -921
-920 AATGACATCTGAAACCTTTTTGAAAGAGAAATTTGCTTGT -881
-880 AGTTTGTTCAGAGCTATTATCGTGGCCTCGGAGCATGGC -841
-840 GGTTGCGGTGGCGGTTGGGTTCGGTTCGGAAGGCTTCGCTCA -801
-800 CCAAAAGTGAGCCGGAGAGGCTTACGACTACACACACGAA -761
-760 TATGAAGTGCAAAAATGAAGGGTCTGGGTACTTACGGGT -721
-720 TCCTTGAGATTGTCAAGTGTGTTGGTTTCGAGGTTTTTCGGC -681
-680 ATCCCTTTCATACAGTAGCTTTTCCCTCTCCTTGCCATGAC -641
-640 TATGCTGTGATGCACTTAGGTAGTTGACATTCACTAGTAC -601
-600 CGTGCTGCGAGGAGCGCGCCCGCCCTTGTCACGTACGT -561
-560 CCCCAAGATGCAAGATGCAACTGTGGGGCAGGGGAGGGGT -521
-520 TCTTAGCACGGAAGAACGCGCCCAATTAATGAGCCACCA -481
-480 GAGCTGCGGTGTCGTCGAGATGACAGCGACCTAGGTACAT -441
-440 AGGCCATCAGCGGAAGGCGGATCGCATGCCTCAGCGCAAG -401
-400 GCTCAAGACATGGCTGAGTAAGTAAGGCCGGTTGAGTGCT -361

-360 CTATGCCCTCTGCGCTTTGATCCCCGCGACGTCCCCGCAC -321
 -320 ACGCAGCAATTGAGCAGTTCCGGTCATCAAGCCTCCCAGGC -281
 -280 GGCCGCTCGGCATCCAGGGGCTCGGCCTCGACGTGCAACC -241
 -240 CGATGCGCCGTGCGAGCGGTTGGCCACCGTGCTTCTGTG -201
 -200 CTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCTGTAG -161
 -160 ATTACAACGTTGCGGCGCGGTGACACCAGTGCATCACG -121
 -120 AACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAAGTGCCCTTCCGGTGC -81
 -80 ATGCAACATGTGAGCGCCTGCTCGAATCGTCTACACTGGA -41
 -40 ACTTCGAAACGTATATTAAGTCTGTTTACTATAACGGCG -1
 1 TAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGT 40
 41 TACGTACCGTTTCGATATCTCGAGACGGTATCGATAAGCT 80
 81 TGATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGG 120
 121 GATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAA 160
 161 GATGGGTGCGCTCGCGGTGTTTCGCGCTCGCTTCCCTCGCG 200
 201 GCAGTGGCGTTCGGTTGCGCATGCGGCCGACACCAAAAGC 240
 241 CCAACTTTGTGTGATCTTACCCGTAAGTATGCCGAGTAG 280
 281 ACTGGGGGCCGACGGGGACGGGGACGGGTTTATAGCTGTC 320
 321 AGACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTGTT 360
 361 ATCGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGC 400
 401 TAACTTCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGCTGCTCCTTGC 440

-160 ATTACAACGTTGCGGCGCGGTGACACCAGTGCATCACG -121
 -120 AACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAAGTGCCCTTCCGGTGC -81
 -80 ATGCAACATGTGAGCGCCTGCTCGAATCGTCTACACTGGA -41
 -40 ACTTCGAAACGTATATTAAGTCTGTTTACTATAACGGCG -1
 1 TAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGT 40
 41 TACGTACCGTTTCGATATCTCGAGACGGTATCGATAAGCTTG 80
 81 ATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGGGA 120
 121 TCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAAGA 160
 161 TGGGTGCCCTCGCGGTGTTTCGCGCTCGCTTGCCTCGCGGC 200
 201 AGTGGCGTTCGGTTGCGCATGCGGGCCGACACCAAAAGCCC 240
 241 AACTTTGTGTGATCTTACCGTAAGTATGCCGAGTAGAC 280
 281 TGGGGGCCGACGGGGACGGGGACGGGTTTATAGCTGTACG 320
 321 ACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTGTTAT 360
 361 CGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGCTA 400
 401 ACTTCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGCTGCTCCTTGTCTC 440

B.3.3 Aox1Δ3/Ars

-920 CTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCATTACAGGCTGCGCAACT -881
 -880 GTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACG -841
 -840 CCAGCTGGCGAAGAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGT -801
 -800 TGGGTAAAGCCAGGGTTTTCACAGTCACGACGTTGTAAAA -761
 -760 CGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGA -721
 -720 ATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCGAGGTTTTCGCGC -681
 -680 ATCCCTTTCATACAGTAGCTTTCCCTCTCTTGCCATGAC -641
 -640 TATGCTGTGATGACGTTAGGTAGTTGACATTATACAGTAC -601
 -600 CGTGCTGCGAGGAGCGCGACCGCCCTTGTGACGCTACGT -561
 -560 CCCCAGATGCAAGATGCAACTGTGGGGCAGGGGAGGGGT -521
 -520 TCTTAGCAGGAAAGAACCGGCCCAATTAATGAGCCACCA -481
 -480 GAGCTGCGGTGTGCTGAGATGACAGCGACCTAGGTACAT -441
 -440 AGGCCATCAGCGGAAGCGGATCGCATGCGCTCAGCGCAAG -401
 -400 GCTCAAGACATGCGCTGAGTAAGTAAGGCCGGTTGAGTGCT -361
 -360 CTATGCCCTCTGCGCTTTGATCCCCGCGACGTCCCCGCAC -321
 -320 ACGCAGCAATTGAGCAGTTCCGGTCATCAAGCCTCCAGGC -281
 -280 GGCCGCTGCGGCATCCAGGGGCTCGGCCTCGACGTGCAACC -241
 -240 CGATGCGCGTGCAGCGGTGGCCACCGTGCTTCTGTG -201
 -200 CTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCTGTAG -161
 -160 ATTACAACGTTGCGGGCGGCTCGACACCGAGTGCATCACG -121
 -120 AACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAAGTGCCCTTCCGGTGC -81
 -80 ATGCAACATGTGAGCGCCTGCTCGAATCGTCTACACTGGA -41
 -40 ACTTCGAAACGTATATTAAGTCTGTTTACTATAACGGCG -1
 1 TAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGT 40
 41 TACGTACCGTTTCGATATCTCGAGACGGTATCGATAAG 80
 81 CTTGATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTT 120
 121 GGGATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCA 160
 161 AAGATGGGTGCCCTCGCGGTGTTTCGCGCTCGCTTGCCTCG 200
 201 CGGCAGTGGCGTCGGTTGCGCATGCGGGCCGACACCAAAAA 240
 241 GCCCAACTTTGTGTGATCTTACCGTAAGTATGCCGAGT 280
 281 AGACTGGGGGCCGACGGGGACGGGGACGGGTTTATAGCTG 320
 321 TCAGACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGT 360
 361 TTATCGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCT 400
 401 GCTAACTTCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGCTGCTCCTTGC 440

B.3.4 Aox1Δ4/Ars

-680 TCCCATTGCGCAATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC -641
 -640 GATCGGTGCGGCCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAA -601
 -600 AGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCA -561
 -560 GGGTTTTCACAGTCACGACGTTGTAAAAAGACGGCGAGTG -521
 -520 AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGG -481
 -480 GCCCCCTCTCGAGGTCGAGATGACAGCGACCTAGGTACAT -441
 -440 AGGCCATCAGCGGAAGGGCGGATCGCATGCGCTCAGCGCAAG -401
 -400 GCTCAAGACATGGCTGAGTAAGTAAGGCCGGTTGAGTGCT -361
 -360 CTATGCCCTCTGCGCTTTGATCCCCGCGACGTCCCCGCAC -321
 -320 ACGCAGCAATTGAGCAGTTCCGGTCAATCAAGCCTCCCGAGC -281
 -280 GGCCGCTCGGCATGGCTGAGTAAAGTAAGGCCGGTTGAGTGCT -241
 -240 CGATGCGCCGTGCGAGCGGTTGGGCCACCGTGCTTCTGTG -201
 -200 CTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCTGTAG -161

B.3.5 Aox1Δ5/Ars

-480 GCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCATTACAGGCTGCGCAAC -441
 -440 GTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC -401
 -400 CCAGCTGGCGAAGAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAG -361
 -360 TTGGGTAAAGCCAGGGTTTTCACAGTCACGACGTTGTAAAA -321
 -320 ACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCG -281
 -280 AATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCGAGGTTGCAACC -241
 -240 CGATGCGCGTGCAGCGGTGGGCCACCGTGCTTCTGTG -201
 -200 CTTGAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCTGTAG -161
 -160 ATTACAACGTTGCGGGCGGCTCGACACCGAGTGCATCACG -121
 -120 AACACGCTCTGACGATGGTGACGGAAAGTGCCCTTCCGGTGC -81
 -80 ATGCAACATGTGAGCGCCTGCTCGAATCGTCTACACTGGA -41
 -40 ACTTCGAAACGTATATTAAGTCTGTTTACTATAACGGCG -1
 1 TAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGT 40
 41 TACGTACCGTTTCGATATCTCGAGACGGTATCGATAAGCTTG 80
 81 ATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGGGA 120
 121 TCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAAGA 160
 161 TGGGTGCCCTCGCGGTGTTTCGCGCTCGCTTGCCTCGCGGC 200
 201 AGTGGCGTTCGGTTGCGCATGCGGGCCGACACCAAAAGCCC 240
 241 AACTTTGTGTGATCTTACCGTAAGTATGCCGAGTAGAC 280
 281 TGGGGGCCGACGGGGACGGGGACGGGTTTATAGCTGTACG 320
 321 ACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTGTTAT 360
 361 CGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGCTA 400
 401 ACTTCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGCTGCTCCTTGTCTC 440

B.3.6 Aox1Δ6/Ars

-280 GGGCGCGTCCCATTGCGCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGG -241
 -240 GAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC -201
 -200 TGCGGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGT -161
 -160 AACGCCAGGGTTTTCACAGTCACGACGTTGTAAAAACGACG -121
 -120 GCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG -81
 -80 GTACCGGGCCCCCTCGAGGTCGAGTCTACACTGGA -41
 -40 ACTTCGAAACGTATATTAAGTCTGTTTACTATAACGGCG -1
 1 TAAATCCTCTCTCGCACTCACTTACCCAAGAACTCAACGT 40
 41 TACGTACCGTTTCGATATCTCGAGACGGTATCGATAAGCTTG 80
 81 ATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGGATCGTTTGGGA 120
 121 TCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGAAACCATCAAGA 160
 161 TGGGTGCCCTCGCGGTGTTTCGCGCTCGCTTGCCTCGCGGC 200
 201 AGTGGCGTTCGGTTGCGCATGCGGGCCGACACCAAAAGCCC 240
 241 AACTTTGTGTGATCTTACCGTAAGTATGCCGAGTAGAC 280
 281 TGGGGGCCGACGGGGACGGGGACGGGTTTATAGCTGTACG 320
 321 ACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAACGGGGTGTGTTAT 360
 361 CGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTTTGCGTCTGCTA 400
 401 ACTTCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGCTGCTCCTTGTCTC 440

B.4 Constructions chimériques *Aox1Δ51/Ars* à *Aox1Δ53/Ars*

B.4.1 *Aox1Δ51/Ars*

```

-480 CCCATTGCGCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG -441
-440 ATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAA -401
-400 GGGGGATGTGCTGCAAGGCGAATTAAGTTGGGTAACGCCAG -361
-360 GGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGCCAGTGA -321
-320 ATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCCAG -281
-280 GGGCTCGGCCTCGACGTGCAACCCGATGCGCCGTGCGAGC -241
-240 GGTGGCCACCGTGCTTCTGTGCTTGAAGTTGATATCCA -201
-200 TAGCTAGAAGTATGACGCTGTAGATTACAACGTTGCGGCG -161
-160 GCGGTCGACACCACTGTCATCAGAACACGCTCTGACGATGG -121
-120 TGACGGAAAGTGCCCTTCCGGTGCATGCAACATGTGAGCGC -81
-80 CTGCTCGAATCGTCTACACTGGTACCGGGCCCCCCTCGA -41
-40 GGTCCGActgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagac -1
1 attatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagat 40
41 cactaccacttctacacaggccactCGAGGTCCGACGGTAT 80
81 CGATAAGCTTGATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGG 120
121 ATCGTTTGGGATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGA 160
161 AACCATCAAGATGGGTGCCCTCGCGGTGTTGCGCGTCGCT 200
201 TGCCCTCGCGCAGTGGCGTCGGTTGCGCATGCGGCCGACA 240
241 CCAAAAAGCCCAACTTTGTGGTGATCTTCACCGTAAGTAT 280
281 GCCGAGTAGACTGGGGGCCCGGACGGGGACGGGGACGGTT 320
321 TTAGCTGTGAGACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAAC 360
361 GGGGTGTTTATCGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTT 400
401 TCGCTCTGCTAACTTCCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGTCC 440

```

B.4.2 *Aox1Δ52/Ars*

```

-400 GCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAAC -361
-360 TGTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC -321
-320 GCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG -281
-280 TTGGGTAACGCCAGGTTTTCAGTCACGACGTTGTAAA -241
-240 ACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCG -201
-200 AATTGGGTACCCAGGGGCTCGGCCCTCGACGTGCAACCCGA -161
-160 TGCGCCGTGCGAGCGGTTGGCCACCGTGCTTCTGTGCTT -121
-120 GAAGTTGATATCCATAGCTAGAAGTATGACGCTGTAGATT -81
-80 ACAACGTTGCGGCGCGGTGCGGTACCGGGCCCCCCTCGA -41
-40 GGTCCGActgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagac -1
1 attatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagat 40
41 cactaccacttctacacaggccactCGAGGTCCGACGGTAT 80
81 CGATAAGCTTGATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGG 120
121 ATCGTTTGGGATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGA 160
161 AACCATCAAGATGGGTGCCCTCGCGGTGTTGCGCGTCGCT 200
201 TGCCCTCGCGCAGTGGCGTCGGTTGCGCATGCGGCCGACA 240
241 CCAAAAAGCCCAACTTTGTGGTGATCTTCACCGTAAGTAT 280
281 GCCGAGTAGACTGGGGGCCCGGACGGGGACGGGGACGGTT 320
321 TTAGCTGTGAGACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAAC 360
361 GGGGTGTTTATCGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTT 400
401 TCGCTCTGCTAACTTCCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGTCC 440

```

B.4.3 *Aox1Δ53/Ars*

```

-320 TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGC -281
-280 CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCT -241
-240 GCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGTTTTCAGT -201
-200 CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGA -161
-160 CTCACATATAGGGCGAATTGGGTACCCAGGGGCTCGGCCCTC -121
-120 GACGTGCAACCCGATGCGCCGTGCGAGCGGTTGGCCACCC -81
-80 GTGCTTCTGTGCTTGAAGTTGGTACCGGGCCCCCCTCGA -41
-40 GGTCCGActgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagac -1
1 attatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagat 40
41 cactaccacttctacacaggccactCGAGGTCCGACGGTAT 80
81 CGATAAGCTTGATATCGAATTAGGCCAACGCTGTCAAGGG 120
121 ATCGTTTGGGATCGGGGCAATCAGCACCGGCTCAGGACGA 160
161 AACCATCAAGATGGGTGCCCTCGCGGTGTTGCGCGTCGCT 200
201 TGCCCTCGCGCAGTGGCGTCGGTTGCGCATGCGGCCGACA 240

```

```

241 CCAAAAAGCCCAACTTTGTGGTGATCTTCACCGTAAGTAT 280
281 GCCGAGTAGACTGGGGGCCCGGACGGGGACGGGGACGGTT 320
321 TTAGCTGTGAGACTGAGGCCATCTATCTGGGTTTACGAAC 360
361 GGGGTGTTTATCGCCGAACCGGTTCCCTCCCTGCCATCCTT 400
401 TCGCTCTGCTAACTTCCCCTGTTGCCCTTCTGGTCTGTCC 440

```

Annexe C

Enzymes sensibles à l'azoture

Liste des enzymes végétales et fongiques sensibles à l'azoture. Dans un premier temps, une série de couples enzyme/espèce ont été extraits en Juin 2002 de la base de données bibliographique BRENDA¹ (CUBIC, Université de Cologne, Allemagne; Schomburg et al. 2002a,b) en interrogeant son champ <Inhibitors> avec les diverses désignations de l'azoture <N3-, NaN3, azide, sodium azide>. Ces entrées individuelles ont ensuite été groupées par enzyme en recourant à la base de données taxonomique du NCBI² (Bethesda, MD, USA) pour ne conserver que celles concernant des végétaux (cyanobactéries, algues, mousses et plantes à graines) ou des champignons. Enfin, les métabolismes assurés par les enzymes retenues ont été recherchés dans la base de données LIGAND³ (Institut for Chemical Research, Université de Kyoto, Japon) et les entrées classées selon la nomenclature EC (Enzyme Commission) établie par la JCBN⁴ (Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Université Queen Mary de Londres, UK).

class	name	EC	metabolism(s)	group(s)
OXIDOREDUCTASES				
acting on the CH-OH group of donors				
with NAD ⁺ or NADP ⁺ as acceptor				
▷	alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	glycolysis/gluconeogenesis fatty acid metabolism bile acid biosynthesis tyrosine metabolism glycerolipid metabolism	green algae
▷	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺)	1.1.1.41	citrate cycle (TCA cycle)	fungi
▷	2-alkyn-1-ol dehydrogenase	1.1.1.165		fungi
▷	indole-3-acetaldehyde reductase (NADH)	1.1.1.190	tryptophan metabolism	eudicots
▷	indole-3-acetaldehyde reductase (NADPH)	1.1.1.191	tryptophan metabolism	eudicots
▷	xanthine dehydrogenase	1.1.1.204	purine metabolism	fungi
with oxygen as acceptor				
▷	hexose oxidase	1.1.3.5	pentose phosphate pathway	red algae
▷	aryl-alcohol oxidase	1.1.3.7		fungi
▷	galactose oxidase	1.1.3.9	galactose metabolism	fungi
▷	alcohol oxidase	1.1.3.13	methane metabolism	fungi
▷	cellobiose oxidase	1.1.3.25		fungi
▷	methanol oxidase	1.1.3.31		fungi
with other acceptors				
▷	glycolate dehydrogenase	1.1.99.14	glyoxylate and dicarboxylate metabolism	green algae

1. <http://www.brenda.uni-koeln.de/>

2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy>

3. http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bfind?ligand

4. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/jcbtn/>

class	name	EC	metabolism(s)	group(s)
acting on the aldehyde or oxo group of donors				
with NAD⁺ or NADP⁺ as acceptor				
▷	formate dehydrogenase	1.2.1.2	glyoxylate and dicarboxylate metabolism methane metabolism	eudicots fungi
with oxygen as acceptor				
▷	indole-3-acetaldehyde oxidase	1.2.3.7	tryptophan metabolism	eudicots
acting on the CH-CH group of donors				
with oxygen as acceptor				
▷	bilirubin oxidase	1.3.3.5	porphyrin and chlorophyll metabolism	fungi
acting on the CH-NH₂ group of donors				
with oxygen as acceptor				
▷	L-amino-acid oxidase	1.4.3.2	alanine and aspartate metabolism methionine metabolism valine, leucine and isoleucine degradation tyrosine metabolism phenylalanine metabolism tryptophan metabolism aromatic amino acid biosynthesis alkaloid biosynthesis I	cyanobacteria
▷	amine oxidase (copper-containing)	1.4.3.6	glycine, serine and threonine metabolism arginine and proline metabolism histidine metabolism tyrosine metabolism phenylalanine metabolism tryptophan metabolism β -alanine metabolism alkaloid biosynthesis II	eudicots
acting on the CH-NH group of donors				
with oxygen as acceptor				
▷	L-pipecolate oxidase	1.5.3.7	lysine degradation	fungi
▷	reticuline oxidase	1.5.3.9	alkaloid biosynthesis I	eudicots
▷	dihydrobenzophenanthridine oxidase	1.5.3.12	alkaloid biosynthesis I	eudicots
acting on NADH or NADPH				
with a nitrogenous group as acceptor				
▷	nitrate reductase (NADH)	1.6.6.1	nitrogen metabolism	diatoms eudicots fungi green algae
▷	nitrate reductase [NAD(P)H]	1.6.6.2	nitrogen metabolism	fungi
▷	nitrate reductase (NADPH)	1.6.6.3	nitrogen metabolism	fungi
▷	hydroxylamine reductase (NADH)	1.6.6.11	nitrogen metabolism	eudicots fungi
acting on other nitrogenous compounds as donors				
with an iron-sulfur protein as acceptor				
▷	ferredoxin-nitrite reductase	1.7.7.1	nitrogen metabolism	monocots
▷	ferredoxin-nitrate reductase	1.7.7.2	nitrogen metabolism	cyanobacteria
acting on a sulfur group of donors				
with oxygen as acceptor				
▷	thiol oxidase	1.8.3.2		fungi

class	name	EC	metabolism(s)	group(s)
acting on heme group of donors				
with oxygen as acceptor				
▷	cytochrome-c oxidase	1.9.3.1	oxidative phosphorylation	cyanobacteria eukaryotes
acting on diphenols and related substances as donors				
with oxygen as acceptor				
▷	catechol oxidase	1.10.3.1	tyrosine metabolism	fungi
▷	laccase	1.10.3.2	lignin biosynthesis	fungi
▷	L-ascorbate oxidase	1.10.3.3	ascorbate and aldarate metabolism	eudicots
▷	o-aminophenol oxidase	1.10.3.4	tryptophan metabolism	eudicots
acting on a peroxide as acceptor				
acting on a peroxide as acceptor				
▷	cytochrome-c peroxidase	1.11.1.5		fungi
▷	catalase	1.11.1.6	tryptophan metabolism methane metabolism	fungi monocots
▷	peroxidase	1.11.1.7	phenylalanine metabolism methane metabolism flavonoid, stilbene and lignin biosynthesis	mosses
▷	chloride peroxidase	1.11.1.10		fungi
▷	L-ascorbate peroxidase	1.11.1.11	ascorbate and aldarate metabolism	eudicots
▷	manganese peroxidase	1.11.1.13	lignin degradation	fungi
acting on single donors with incorporation of molecular oxygen (oxygenases)				
with incorporation of two atoms of oxygen				
▷	indole 2,3-dioxygenase	1.13.11.17	tryptophan metabolism	eudicots
▷	2,3-dihydroxybenzoate 2,3-dioxygenase	1.13.11.28		eudicots
acting on paired donors with incorporation of molecular oxygen				
with NADH or NADPH as one donor, and incorporation of one atom of oxygen				
▷	trans-cinnamate 4-monooxygenase	1.14.13.11	phenylalanine metabolism flavonoid, stilbene and lignin biosynthesis	eudicots
▷	flavonoid 3'-monooxygenase	1.14.13.21	flavonoid, stilbene and lignin biosynthesis	eudicots monocots
▷	anthranilate 3-mono-oxygenase (deaminating)	1.14.13.35	phenylalanine metabolism carbazole degradation nitrogen metabolism	fungi
with another compound as one donor, and incorporation of one atom of oxygen				
▷	monophenol monooxygenase	1.14.18.1	tyrosine metabolism riboflavin metabolism flavonoid, stilbene and lignin biosynthesis alkaloid biosynthesis I	eudicots fungi monocots
acting on superoxide radicals as acceptor				
acting on superoxide radicals as acceptor				
▷	superoxide dismutase	1.15.1.1		eudicots flowering plants kinetoplastids monocots red algae seed plants

class	name	EC	metabolism(s)	group(s)
TRANSFERASES				
	glycosyltransferases			
	hexosyltransferases			
	▷ mannotetraose 2- α -N-acetyl-glucosaminyltransferase	2.4.1.138		fungi
	transferring phosphorus-containing groups			
	diphosphotransferases			
	▷ thiamine pyrophosphokinase	2.7.6.2	thiamine metabolism	eudicots
HYDROLASES				
	acting on ester bonds			
	phosphoric monoester hydrolases			
	▷ 3-phytase	3.1.3.8	inositol phosphate metabolism	fungi
	glycosidases			
	hydrolysing O-glycosyl compounds			
	▷ dextranase	3.2.1.11		fungi
	▷ polygalacturonase	3.2.1.15	pentose and glucuronate interconversions starch and sucrose metabolism	fungi
	▷ α -mannosidase	3.2.1.24	N-glycan degradation	fungi
LYASES				
	carbon-carbon lyases			
	carboxy-lyases			
	▷ aromatic-L-amino-acid decarboxylase	4.1.1.28	histidine metabolism tyrosine metabolism phenylalanine metabolism tryptophan metabolism alkaloid biosynthesis I	eudicots
	▷ phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	4.1.1.49	citrate cycle (TCA cycle) pyruvate metabolism carbon fixation	fungi
	aldehyde-lyases			
	▷ mandelonitrile lyase	4.1.2.10	cyanoamino acid metabolism	eudicots
	carbon-oxygen lyases			
	hydro-lyases			
	▷ carbonate dehydratase	4.2.1.1	nitrogen metabolism	eudicots green algae
	▷ uroporphyrinogen-III synthase	4.2.1.75	porphyrin and chlorophyll metabolism	euglenoids
	other lyases			
	other lyases			
	▷ cysteine synthase	4.2.99.8	cysteine metabolism selenoamino acid metabolism sulfur metabolism	monocots
LIGASES				
	forming carbon-oxygen bonds			
	ligases forming aminoacyl-tRNA and related compounds			
	▷ cysteine-tRNA ligase	6.1.1.16	cysteine metabolism aminoacyl-tRNA biosynthesis	eudicots

Annexe D

Analyse bioinformatique des promoteurs *Aox1* et *Aox2*

Résultats bruts et détails d'implémentation de l'analyse bioinformatique des promoteurs *Aox1* et *Aox2*. Cette annexe se compose d'une série de fichiers fournis en entrée ou produits en sortie par divers programmes du GCG Wisconsin Package 10.3. Les annotations qu'ils comportent devraient aider à la compréhension de la fonction de chacun.

D.1 Relevé d'éléments conservés chez *C. reinhardtii*

▷ *cis_cr.25.dat*

!!CIS_CR 2.5 by Denis BAURAIN (2001-2002).
A Chlamydomonas reinhardtii cis-acting element pattern data file for the GCG program FINDPATTERNS.

Name	Offset	Pattern	Overhang	Documentation ..
CAP-sequence	1	GCsCCCCGATTksmmAGrCATT	0	! [T] TUBA1, TUBB2 ! Brunke et al. (1984)
full-TUB-box	1	GCTCsAAGGCKsbmmG	0	! [T] TUBA1, TUBA2, TUBB1, TUBB2, CBLP ! Brunke et al. (1984); Schloss (1990)
core-TUB-box	1	GCTCsAAGGC	0	! [T] TUBA1, TUBA2, TUBB1, TUBB2, ACTIN, CYTC ! Brunke et al. (1984); Sugase et al. (1996); ! Felitti et al. (2000)
GC-rich-region	1	As{10,11}A	0	! [X] TUBA1, TUBA2, TUBB1, TUBB2 ! Brunke et al. (1984); Bandziulis & Rosenbaum (1988); ! Davies et al. (1994)
GC-like-box	1	CGGGCG	0	! [T] TUBA1, TUBA2, TUBB1, TUBB2
ATB-box	1	TTCGGGG	0	! [T] TUBA1, TUBA2, TUBB1, TUBB2
C-box	1	CAGCCCCy	0	! [T] TUBA1, TUBB2 ! Periz & Keller (1997)
28-bp-TUBA-elt	1	GTTGGkACGCrGGTCATTAmSCCTCGCG	0	! [X] Vc/Cr TUBA1, TUBA2 ! Mages et al. (1995); Periz & Keller (1997)
CYTC-repeat	1	T{,1}CAGyCCAyAsTrCCyTGCC	0	! [T] CYTC ! Felitti et al. (2000)
CuRE-1	1	GTATGG	0	! [X] CYC6
inv-CuRE	1	GGTATG	0	! [X] CYC6 ! Quinn & Merchant (1995)
CuRE-2	1	CTGCCA	0	! [X] CYC6 ! Quinn & Merchant (1995); Quinn et al. (2000)
mock-CuRE	1	TCATTG	0	! [X] / ! Quinn et al. (2000)
core-CuRE-HyRE	1	GTAC	0	! [X] CYC6, CPX1, CRD1 ! Quinn et al. (1999, 2000, 2002); Moseley et al. (2000)
RBCS-box	1	TATCCGGAAGC	0	! [T] RBCS1, RBCS2 ! Goldschmidt-Clermont & Rahire (1986)
TGACG-box	1	TGACG	0	! [T] CSBP, CABII-I ! Hahn et al. (1998)

CGCGCAC-box	1	CGCGCAC	0	! [T] LHCBI, GSA, CSBP, RBCS, CYTC ! Hahn & Kuck (1999); Felitti et al. (2000)
CATTTC-box	1	CATTTC	0	! [T] LHCBI, GSA, CSBP
GAATCG-box	1	GAATCG	0	! [T] LHCBI, GSA, RBCS
GGCGAG-box	1	GGCGAG	0	! [T] LHCBI, RBCS ! Hahn & Kuck (1999)
low-CO2-ind	1	CGCGCC	0	! [T] CAH1, bCA-1, bCA-2, LIP-36
low-CO2-ind+1	1	GGGTTGAAnTCCC	0	! [T] CAH1, bCA-1, bCA-2
low-CO2-ind+2	1	AACCCCGnGnTGCA	0	! [T] CAH1, bCA-1, bCA-2
CO2-related+	1	AGCGGCTCGC	0	! [T] CAH1, CAH2
part-LRCEB-III	1	ATTTTCAC	0	! [T] CAH1
G-box-like-C	1	CACGTTG	0	! [T] CAH1 ! Kucho et al. (1999)
12-bp-repeat	1	GAAGGGCCGCGA	0	! [T] HSP70A
G-box-like-H	1	GTGACGTGGG	0	! [T] HSP70A
CCAAT-box-like	1	CAAAATT	0	! [T] HSP70A ! Muller et al. (1992)
inv-CCAAT-box	1	ATTGG	0	! [T] HSP70A
inv-HSE-repeat	1	nTTcnnGAAnnTTCn	0	! [X] HSP70A ! Kropat et al. (1995)
HSE-repeat	1	nGAAnnTTCnnGAAn	0	! [X] HSP70A ! Muller et al. (1992); Kropat et al. (1995)
short-HSE	1	nGAAnnTTCn	0	! [T] FE-SOD
inv-short-HSE	1	nTTcnnGAAn	0	! [T] / ! Chen et al. (1996)
TRXH-repeat	1	TCACGn7TsrCk	0	! [T] TRX-h ! Lemaire et al. (1999)
CRE-AP-1	1	TGACGCCA	0	! [X] GPXH ! Leisinger et al. (2001)
palindrome	1	AATGCATT	0	! [X] NIA1
9-bp-dupl-box	1	GGCCCCGGG	0	! [X] NIA1 ! Loppes & Radoux (2001)
8-bp-dupl-box	1	GACCCCGC	0	! [X] NIA1
imp-dupl-box	1	CGA{1,2}CTT	0	! [X] NIA1
homol-E-like	1	AkGGwAGGGT	0	! [X] NIA1 ! Loppes & Radoux (2001, 2002)
NIT4-box	1	TGGGAGGGCCTCAC	0	! [N] Cv NR
NIT2-box	1	TC TTGATATGATC	0	! [X] Cv NR
NIT2-like-box	1	CTTTGGATTGTC	0	! [N] Cv NR ! Cannons & Shiflett (2001)

D.2 Analyse du promoteur *Aox1*

▷ *paox1.composition*

COMPOSITION of: *paox1.seq* Check: 828 from: 1 to: 1,403

October 28, 2002 14:30

```

*****

A: 304      C: 370      G: 403      T: 326

Other: 0

Total: 1,403

*****

GG: 85      GA: 86      GT: 106      GC: 125
AG: 83      AA: 75      AT: 62      AC: 84
TG: 121     TA: 58      TT: 73      TC: 74
CG: 114     CA: 85      CT: 84      CC: 87

Other: 0

Total: 1,402

*****

```

```

GGG: 16      GGA: 13      GGT: 26      GGC: 30
GAG: 23      GAA: 24      GAT: 18      GAC: 21
GTG: 42      GTA: 18      GTT: 27      GTC: 19
GCG: 42      GCA: 31      GCT: 28      GCC: 24

AGG: 20      AGA: 19      AGT: 22      AGC: 22
AAG: 26      AAA: 19      AAT: 9       AAC: 21
ATG: 24      ATA: 14      ATT: 9       ATC: 15
ACG: 28      ACA: 19      ACT: 19      ACC: 18

TGG: 21      TGA: 29      TGT: 27      TGC: 44
TAG: 14      TAA: 7       TAT: 17      TAC: 20
TTG: 27      TTA: 13      TTT: 12      TTC: 21
TCG: 25      TCA: 16      TCT: 14      TCC: 19

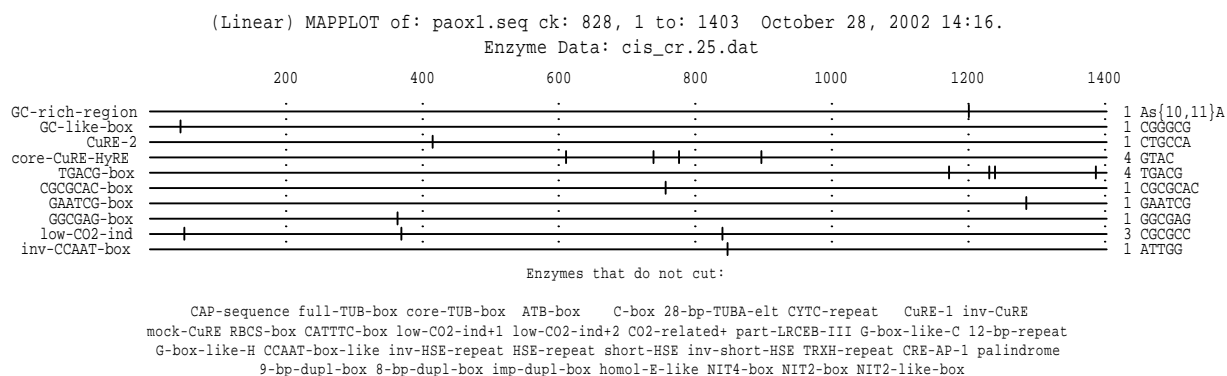
CGG: 28      CGA: 25      CGT: 31      CGC: 29
CAG: 20      CAA: 25      CAT: 18      CAC: 22
CTG: 28      CTA: 13      CTT: 25      CTC: 18
CCG: 19      CCA: 19      CCT: 23      CCC: 26

Other: 0

Total: 1,401

*****

```

▷ *paox1.mapplot*▷ *paox1.find*

! FINDPATTERNS on paox1.seq allowing 0 mismatches

! Using patterns from: cis_cr.25.dat October 28, 2002 14:16 ..

paox1.seq ck: 828 len: 1,403 ! PAOX1

```

GC-rich-region /Rev Ts{10,11}T
                    TS{10}T
1,192: AACGT TGCGGCGGCGGT CGACA

```

```

GC-like-box      CGGGCG
45: GAGGG CGGGCG CGTTC

```

```

CuRE-2           CTGCCA
415: AGGCG CTGCCA GAATG

```

```

core-CuRE-HyRE   GTAC
610: CGTGG GTAC TTACG
738: CATAC GTAC CGTGC
776: TGCAC GTAC GTCCC
896: CCTAG GTAC ATAGG

```

```

TGACG-box        TGACG
1,171: AAGTA TGACG CTGTA
1,230: ACGTC TGACG ATGGT
1,239: GATGG TGACG GAAAG

```

```

TGACG-box /Rev      CGTCA
          1,384: CGTTA CGTCA CCGTT

CGCGCAC-box          CGCGCAC
          756: AGGAG CGCGCAC CGCCC

GAATCG-box          GAATCG
          1,285: TGCTC GAATCG TCTAC

GGCGAG-box          GGCGAG
          363: CGTAG GGCGAG CGCGC

low-CO2-ind          CGCGCC
          369: GCGAG CGCGCC GACGG
          839: AAGAA CGCGCC CAATT

low-CO2-ind /Rev      GGCGCG
          47: GGGCG GGCGCG TTCAA

inv-CCAAT-box /Rev    CCAAT
          844: CGCGC CCAAT TAATG

Total finds:          18
Total length:         1,403
Total sequences:       1
CPU time:              00.03

```

D.3 Analyse du promoteur Aox2

▷ *paox2.composition*

COMPOSITION of: paox2.seq Check: 3077 from: 1 to: 1,115

October 28, 2002 14:30

```

*****

A: 223      C: 310      G: 334      T: 248

Other: 0

Total: 1,115

*****

GG: 82      GA: 60      GT: 76      GC: 115
AG: 59      AA: 56      AT: 43      AC: 65
TG: 90      TA: 41      TT: 72      TC: 45
CG: 103     CA: 66      CT: 57      CC: 84

Other: 0

Total: 1,114

*****

GGG: 20      GGA: 10      GGT: 18      GGC: 34
GAG: 15      GAA: 12      GAT: 12      GAC: 21
GTG: 28      GTA: 9       GTT: 22      GTC: 17
GCG: 39      GCA: 22      GCT: 27      GCC: 27

AGG: 14      AGA: 15      AGT: 7       AGC: 23
AAG: 15      AAA: 18      AAT: 7       AAC: 16
ATG: 17      ATA: 12      ATT: 10      ATC: 4
ACG: 23      ACA: 18      ACT: 7       ACC: 17

TGG: 19      TGA: 19      TGT: 27      TGC: 25
TAG: 12      TAA: 11      TAT: 9       TAC: 9
TTG: 23      TTA: 14      TTT: 24      TTC: 11
TCG: 15      TCA: 12      TCT: 5       TCC: 13

CGG: 29      CGA: 16      CGT: 24      CGC: 33
CAG: 17      CAA: 15      CAT: 15      CAC: 19

```

CTG: 22 CTA: 6 CTT: 16 CTC: 13
CCG: 26 CCA: 13 CCT: 18 CCC: 27

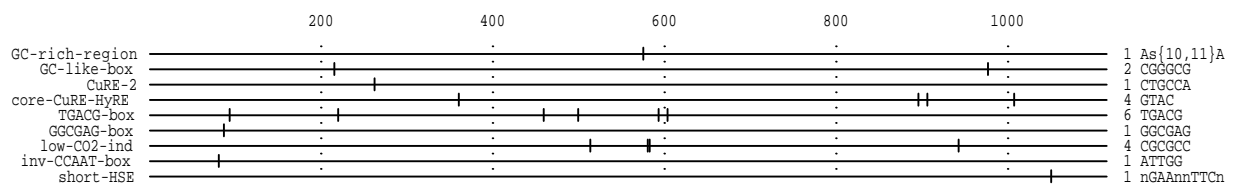
Other: 0

Total: 1,113

▷ *paox2.mapplot*

(Linear) MAPPLOTT of: paox2.seq ck: 3077, 1 to: 1115 October 28, 2002 14:16.

Enzyme Data: cis_cr.25.dat



Enzymes that do not cut:

CAP-sequence full-TUB-box core-TUB-box ATB-box C-box 28-bp-TUBA-elt CYTC-repeat CuRE-1 inv-CuRE
mock-CuRE RBCS-box CGCGCAC-box CATTTC-box GAATCG-box low-CO2-ind+1 low-CO2-ind+2 CO2-related+ part-LRCEB-III
G-box-like-C 12-bp-repeat G-box-like-H CCAAT-box-like inv-HSE-repeat HSE-repeat inv-short-HSE TRXH-repeat
CRE-AP-1 palindrome 9-bp-dupl-box 8-bp-dupl-box imp-dupl-box homol-E-like NIT4-box NIT2-box NIT2-like-box

▷ *paox2.find*

! FINDPATTERNS on paox2.seq allowing 0 mismatches

! Using patterns from: cis_cr.25.dat October 28, 2002 14:17 ..

paox2.seq ck: 3077 len: 1,115 !

GC-rich-region As{10,11}A
 AS{10}A

575: GAAAC AGCGGCGCGCCA CAAAG

GC-like-box /Rev CGCCCG
211: GTAGG CGCCCG CGTCA
972: GTTGT CGCCCG CCATG

CuRE-2 CTGCCA
262: TTTTC CTGCCA TAAGG

core-CuRE-HyRE GTAC
360: ATGTC GTAC ACTTA
895: TGCTG GTAC CGGCG
906: GCGCT GTAC CGACC
1,007: GACAC GTAC CGCGA

TGACG-box TGACG
93: GCGAG TGACG TGACT
499: ACACG TGACG AGGCT
593: AAAGG TGACG CGGGG
603: CGGGG TGACG AAGCG

TGACG-box /Rev CGTCA
217: GCCCG CGTCA AGGTG
456: CAAAA CGTCA AATGC

GGCGAG-box GGCGAG
87: TTGGC GGCGAG TGACG

low-CO2-ind CGCGCC
513: TAAAA CGCGCC TGCTG
580: AGCGG CGCGCC AAAAA
942: GGTAA CGCGCC ACGCA

low-CO2-ind /Rev GGCGCG
578: ACACG GGCGCG CCACA


```

inv-CCAAT-box      ATTGG
                   81: TGTGT ATTGG CGGCG

short-HSE           nGAAnnTTCn
                   1,050: CGAGT CGAAACTTCC ATTGC

```

```

Total finds:      21
Total length:     1,115
Total sequences:  1
CPU time:         00.02

```

D.4 Étude de simulation appliquée au promoteur *Aox1*

▷ *paox1.lookup.0*

CAP-sequence /GCsCCCGATTkmmAGrCATT/

Pattern not found!

full-TUB-box /GCTCsAAGGCKsbmmG/

Pattern not found!

core-TUB-box /GCTCsAAGGC/

1 ** 9

```

Total finds:      9 (0.009 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 9 (0.9 %)

```

GC-rich-region /As11A/

```

1 ***** 309
2 ***** 58
3 ** 6

```

```

Total finds:      443 (0.443 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 373 (37.3 %)

```

GC-like-box /CGGGCG/

```

1 ***** 372
2 ***** 217
3 ***** 57
4 **** 17
5 * 3

```

```

Total finds:      1060 (1.060 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 666 (66.6 %)

```

ATB-box /TTCGGGG/

```

1 ***** 113
2 ** 8

```

```

Total finds:      129 (0.129 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 121 (12.1 %)

```

C-box /CAGCCCCy/

```

1 ***** 69
2 * 3

```

```

Total finds:      75 (0.075 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 72 (7.2 %)

```

28-bp-TUBA-elt /GTTGGkACGCrGGTCATTAmSCCTCGCG/

Pattern not found!

CYTC-repeat /TlCAGyCCAyAsTrCCyTGCC/

Pattern not found!

CuRE-1 /GTATGG/

```
1 ***** 292
2 ***** 71
3 *** 11
4 * 2
```

Total finds: 475 (0.475 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 376 (37.6 %)

inv-CuRE /GGTATG/

```
1 ***** 301
2 ***** 91
3 *** 13
4 * 2
```

Total finds: 530 (0.530 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 407 (40.7 %)

CuRE-2 /CTGCCA/

```
1 ***** 379
2 ***** 201
3 ***** 55
4 *** 11
5 * 2
```

Total finds: 1000 (1.000 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 648 (64.8 %)

mock-CuRE /TCATTG/

```
1 ***** 322
2 ***** 103
3 ***** 25
4 * 1
```

Total finds: 607 (0.607 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 451 (45.1 %)

core-CuRE-HyRE /GTAC/

```
1 **** 16
2 ***** 72
3 ***** 144
4 ***** 175
5 ***** 173
6 ***** 163
7 ***** 124
8 ***** 67
9 ***** 37
10 *** 15
11 ** 6
12 * 3
13 * 1
```

Total finds: 5137 (5.137 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 996 (99.6 %)

RBCS-box /TATCCGGAAGC/

Pattern not found!

TGACG-box /TGACG/

```

1 ***** 80
2 ***** 172
3 ***** 222
4 ***** 194
5 ***** 143
6 ***** 91
7 ***** 35
8 **** 20
9 ** 7
10 * 1
11 * 2

```

Total finds: 3627 (3.627 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 967 (96.7 %)

CGCGCAC-box /CGCGCAC/

```

1 ***** 325
2 ***** 92
3 **** 20
4 * 4

```

Total finds: 585 (0.585 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 441 (44.1 %)

CATTTC-box /CATTTC/

```

1 ***** 338
2 ***** 87
3 ***** 23
4 * 3
5 * 1

```

Total finds: 598 (0.598 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 452 (45.2 %)

GAATCG-box /GAATCG/

```

1 ***** 330
2 ***** 85
3 ***** 21
4 * 3

```

Total finds: 575 (0.575 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 439 (43.9 %)

GGCGAG-box /GGCGAG/

```

1 ***** 391
2 ***** 163
3 ***** 51
4 **** 18
5 * 1

```

Total finds: 947 (0.947 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 624 (62.4 %)

```
low-CO2-ind      /CGCGCC/

1 ***** 330
2 ***** 266
3 ***** 120
4 ***** 54
5 *** 12
6 * 2
7 * 1
```

```
Total finds:      1517 (1.517 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 785 (78.5 %)
```

```
low-CO2-ind+1    /GGGTTGAAnTCCC/

1 * 1
```

```
Total finds:      1 (0.001 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 1 (0.1 %)
```

```
low-CO2-ind+2    /AACCCnGnTGCA/

1 * 1
```

```
Total finds:      1 (0.001 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 1 (0.1 %)
```

```
CO2-related+     /AGCGGCTCGC/

1 * 2
```

```
Total finds:      2 (0.002 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 2 (0.2 %)
```

```
part-LRCEB-III   /ATTTTCAC/

1 ***** 44
```

```
Total finds:      44 (0.044 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 44 (4.4 %)
```

```
G-box-like-C     /CACGTTG/

1 ***** 244
2 ***** 49
3 ** 7
4 * 1
```

```
Total finds:      367 (0.367 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 301 (30.1 %)
```

```
12-bp-repeat     /GAAGGCCGCGA/

### Pattern not found! ###
```

```
G-box-like-H     /GTGACGTGGG/

1 * 5
```

```
Total finds:      5 (0.005 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 5 (0.5 %)
```

CCAAT-box-like /CAAATT/

```
1 ***** 315
2 ***** 82
3 ** 9
4 * 1
```

Total finds: 510 (0.510 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 407 (40.7 %)

inv-CCAAT-box /ATTGG/

```
1 ***** 244
2 ***** 302
3 ***** 182
4 ***** 82
5 ***** 33
6 *** 14
7 * 5
9 * 2
```

Total finds: 2024 (2.024 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 864 (86.4 %)

inv-HSE-repeat /nTTCnnGAAnnTTCn/

```
1 ** 6
```

Total finds: 6 (0.006 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 6 (0.6 %)

HSE-repeat /nGAAnnTTCnnGAAn/

```
1 ** 6
```

Total finds: 6 (0.006 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 6 (0.6 %)

short-HSE /nGAAnnTTCn/

```
1 ***** 214
2 ***** 30
```

Total finds: 274 (0.274 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 244 (24.4 %)

inv-short-HSE /nTTCnnGAAn/

```
1 ***** 213
2 ***** 22
3 * 4
```

Total finds: 269 (0.269 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 239 (23.9 %)

TRXH-repeat /TCACGn7TsrCk/

```
1 ***** 43
2 * 1
```

Total finds: 45 (0.045 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 44 (4.4 %)

CRE-AP-1 /TGACGCCA/

```
1 ***** 74
```

Total finds: 74 (0.074 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 74 (7.4 %)

palindrome /AATGCATT/

1 ***** 25
2 * 1

Total finds: 27 (0.027 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 26 (2.6 %)

9-bp-dupl-box /GGCCCCGGG/

1 * 3

Total finds: 3 (0.003 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 3 (0.3 %)

8-bp-dupl-box /GACCCCGC/

1 ***** 48
2 * 1

Total finds: 50 (0.050 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 49 (4.9 %)

imp-dupl-box /CGA2CTT/

1 ***** 373
2 ***** 162
3 ***** 59
4 * 4
5 * 4
6 * 1

Total finds: 916 (0.916 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 603 (60.3 %)

homol-E-like /AkGGwAGGGT/

1 * 3

Total finds: 3 (0.003 finds/shuffle)
Shuffles with finds: 3 (0.3 %)

NIT4-box /TGGGAGGGCCTCAC/

Pattern not found!

NIT2-box /TCTTGATATGATC/

Pattern not found!

NIT2-like-box /CTTTGGATTGTC/

Pattern not found!

▷ *paox1.xxx.build*

GAATCG-box	0.575	0.548	0.552	0.539	0.568	0.533	0.575	0.564	0.588	0.539	<0.558>
GAATCG-box	43.9	43.2	42.2	40.0	44.9	41.1	43.8	42.1	44.4	41.0	<42.7>
GGCGAG-box	0.947	0.922	0.875	0.908	0.842	0.927	0.949	0.841	0.898	0.934	<0.904>
GGCGAG-box	62.4	61.0	58.5	60.7	57.5	60.5	61.3	57.7	58.3	62.2	<60.0>
GC-like-box	1.060	1.044	1.046	1.079	1.069	1.132	1.032	1.099	1.083	1.055	<1.070>
GC-like-box	66.6	63.3	65.5	67.1	67.1	70.0	64.7	68.7	66.0	65.4	<66.4>
low-CO2-ind	1.517	1.572	1.498	1.565	1.611	1.545	1.528	1.615	1.539	1.543	<1.553>
low-CO2-ind	78.5	79.7	77.3	78.8	80.5	80.6	78.8	79.8	78.6	78.7	<79.1>

D.5 Code source

▷ *fp_run*

```
#!/bin/csh
echo "fp_run 2.0 by Denis BAURAIN (June-October 2002)"

if ($3 == "") then
cat <<EOF
This CSH script shuffles the file <sequence> <number> times, searches for patterns given in the
FINDPATTERNS (GCG) file <patterns> and compute some stat data about the pattern occurrences.
Final output is in file <sequence>.lookup, but intermediate output remains available. Note that
the dinucleotide composition of the original sequence is preserved in the shuffled sequences.
Usage: fp_run <sequence>.seq <patterns>.dat <number>
EOF
exit (1)
endif

echo "Removing <$1:r.shuffle.n> and <$1:r.find.n> files from previous run..."
rm -f $1:r.find.*
rm -f $1:r.shuffle.*

echo "Starting GCG..."
source /sw/gcg/gcgstartup ; gcg

echo "Shuffling <$1> <$3> times then searching for patterns given in <$2>..."
set i = 0
while ($i < $3)
shuffle -in=$1 -out=$1:r.shuffle.$i -preserve=2 -default
findpatterns -in=$1:r.shuffle.$i -out=$1:r.find.$i -data=$2 -default
@ i = ($i + 1)
end

echo "Counting pattern occurrences and sorting results into <$1:r.count>..."
cat $1:r.find.* | awk -f fp_count | sort -k 1,2 -k 2n,3 > $1:r.count

echo "Building final output into <$1:r.lookup>..."
cat $2 | awk -f fp_lookup sequence=$1:r.count > $1:r.lookup

echo "Run done."
```

▷ *fp_repeat*

```
#!/bin/csh
echo "fp_repeat 1.0 by Denis BAURAIN (October 2002)"

if ($4 == "") then
cat <<EOF
This CSH script repeats <i> times the execution of the fp_run script then save and rename each
.count and .lookup file. Because of storage considerations, intermediate output of the last run
is the only one remaining available.
Usage: fp_repeat <sequence>.seq <patterns>.dat <number> <i>
EOF
exit (1)
endif

echo "Removing <$1:r.count.n> and <$1:r.lookup.n> files from previous repeat..."
rm -f $1:r.count.*
rm -f $1:r.lookup.*

set i = 0
while ($i < $4)
echo "### Run $i (stop at $4) ###"
fp_run $1 $2 $3
mv -f $1:r.count $1:r.count.$i
mv -f $1:r.lookup $1:r.lookup.$i
@ i = ($i + 1)
end

echo "### All runs done. ###"
```

▷ *fp_harvest*

```
#!/bin/csh
echo "fp_harvest 1.0 by Denis BAURAIN (October 2002)"

if ($3 == "") then
cat <<EOF
This CSH script harvests stat data for pattern <name> in <i> shuffled sets of file <sequence>.
Final output is in file <sequence>.<name>.build, but intermediate output remains available.
Usage: fp_harvest <sequence>.seq <name> <i>
EOF
exit (1)
endif

echo "Removing <$1:r.$2.report.n> files from previous harvest..."
rm -f $1:r.$2.report.*

echo "Harvesting stat data for <$2> in <$3> shuffled sets of <$1>..."
set i = 0
while ($i < $3)
cat $1:r.count.$i | awk -f fp_report name=$2 > $1:r.$2.report.$i
@ i = ($i + 1)
end

echo "Building final output into <$1:r.$2.build>..."
cat $1:r.$2.report.* | awk -f fp_build name=$2 > $1:r.$2.build

echo "Harvest done."
```

▷ *fp_count*

```
# fp_count 2.0 by Denis BAURAIN (June-October 2002)

# This AWK filter parses a bunch (*) of FINDPATTERNS (GCG) output files and counts the occurrences
# of each pattern.
# Usage: cat <sequence>.find.* | awk -f fp_count | sort -k 1,2 -k 2n,3 > <sequence>.count

function fill (char, n, string) {          # return a row of <n> <char> (max 80 <char>)
    if (n > 80)
        string = fill(char, 39) "/" fill(char, 39)
    else
        for (i = 0; i < n; i++)
            string = string char
    return string
}

$0 ~ /^! FINDPATTERNS/ {                  # add the current FINDPATTERNS output file to the shuffle count
    f++
}

$0 ~ /^([[:alpha:]]|[[[:digit:]]])/ {      # read the current pattern name
    key = $1
}

$0 ~ /^[[:blank:]]+[[[:digit:]]+]*[[[:digit:]]*/ { # count this occurrence of the current pattern
    temp[key]++
}

$0 ~ /^[[:blank:]]+CPU time:/ {           # at the end of the current FINDPATTERNS output file
    for (key in temp) {                   # for each pattern found
        store[key, temp[key]]++          # store the occurrence count
        delete temp[key]                 # reset the occurrence count...
        # ...before reading the next output file
    }
}

END {                                     # at the end of the input
    for (combined in store) {             # for each combination of pattern name/occurrence count
        split (combined, separate, SUBSEP) # print a line with the pattern name, its...
        printf ("%15s %3d %s %d\n",        # ...occurrence count and the number of...
            separate[1], separate[2], fill(" ", store[combined] / 5), store[combined])
        # ...shuffles having this occurrence count
    }

    print ("### file count", f, "###")    # print the shuffle file count
}
```

▷ *fp_report*

```
# fp_report 2.0 by Denis BAURAIN (June-October 2002)

# This AWK filter parses a fp_count output file <sequence> and reports some stat data for the pattern
# <name> of sequence <pattern>.
# Usage: cat <sequence>.count | awk -f fp_report name=<name> [pattern=<pattern>] [> <sequence>.<name>.report]

$1 == "###" {
    printf ("\n%-15s /%s/\n\n", name, pattern)      # at the beginning of the fp_count output file
                                                    # print the pattern <name> and <pattern>
    f = $4                                           # read the shuffle count
}

$1 == name {
    print $2, $3, $4                                # at the next combination of...
                                                    # ...pattern name/occurrence count/number of shuffles
    total += $2 * $4                                # print a line with the occurrence count of the pattern...
    shuffles += $4                                  # ...and the number of shuffles having this occurrence count
                                                    # add this bunch of occurrences to the total finds count
                                                    # add this number of shuffles to the shuffles with finds count
}

END {
    if (total > 0) {
        printf ("\nTotal finds: %d\t(%3.3f finds/shuffle)", total, total / f)
        printf ("\nShuffles with finds: %d\t(%2.1f %%) \n\n", shuffles, shuffles / f * 100)
    }
    else
        printf "### Pattern not found! ###\n\n"
    # print an error message
}
```

▷ *fp_lookup*

```
# fp_lookup 1.0 by Denis BAURAIN (October 2002)

# This AWK filter parses the FINDPATTERNS (GCG) file <patterns> and looks up for finds of each
# pattern in the fp_count output file <sequence>.
# Usage: cat <patterns>.dat | awk -f fp_lookup sequence=<sequence>.count > <sequence>.lookup

$1 ~ /^[[:alpha:]]+[[:digit:]]/ {
    if (started) {
        system ("cat " "sequence" | awk -f fp_report name="$1" pattern="$3")
    }
    # at the next pattern
    # look up for finds of this particular pattern...
    # ...in the fp_count output file <sequence> using fp_report
}

$0 ~ /\.\. [[:blank:]]*$/ {
    started = 1
    # at the GCG file start signal (...)
    # begin pattern parsing
}
```

▷ *fp_build*

```
# fp_build 1.0 by Denis BAURAIN (October 2002)

# This AWK filter parses a bunch (*) of fp_report output files and builds a table of occurrence
# frequencies (including the average frequency) for pattern <name> in shuffled sets of file <sequence>.
# Usage: cat <sequence>.<name>.report.* | awk -f fp_build name=<name> > <sequence>.<name>.build

$0 ~ /^Total finds:/ {
    value = substr($4, 2)
    total_string = total_string "\t" value
    total_count += value
    count++
}

$0 ~ /^Shuffles with finds:/ {
    value = substr($5, 2)
    shuffle_string = shuffle_string "\t" value
    shuffle_count += value
}

END {
    printf ("%15s\t<%3.3f>\n", name, total_string, total_count / count)
    printf ("%15s\t<%2.1f>\n", name, shuffle_string, shuffle_count / count)
}
```

